

HÄMOSTASEPARAMETER UNTER
OPERATIVER BELASTUNG: EIN
VERGLEICH VON TUMORRESEKTIONEN
MIT OPERATIONEN BEI
NICHT MALIGNEN ERKRANKUNGEN

Heidrun Rita Agster

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554819_0051

Aus der Medizinischen Klinik III im Klinikum Großhadern
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns

HÄMOSTASEPARAMETER UNTER OPERATIVER BELASTUNG:
EIN VERGLEICH VON TUMORRESEKTIONEN MIT OPERATIONEN BEI
NICHT MALIGNEN ERKRANKUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Heidrun Rita Agster

aus
München

Jahr
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter

Prof.Dr.W.Wilmanns

Mitberichterstatter

Dekan

Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung

05.12.1985

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
KAPITEL 1:	
EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
KAPITEL 2:	
PHYSIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1 Der Gerinnungsvorgang	4
2.1.1 Die vier Gerinnungsphasen	4
2.1.2 Antithrombin III und die Wirkungsweise von Heparin	7
2.1.3 Fibrinogen	8
2.1.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften	8
2.1.3.2 Proteinstruktur	9
2.1.3.3 Physiologische Bedeutung von Fibrinogen	11
2.2 Die Fibrinolyse	12
KAPITEL 3:	
METHODIK	15
3.1 Patientenkollektiv	15
3.2 Blutabnahme und Verarbeitung der Blutproben	16
3.3 Fibrinogen	18
3.3.1 Gerinnbares Protein	18
3.3.2 Radiale Immundiffusion	20
3.3.3 Hitzepräzipitation	23
3.4 Fibrinopeptid A (FPA)	25
3.5 Antithrombin III (AT III)	31

	<u>Seite</u>
3.5.1	Bestimmung mit chromogenem Substrat 32
3.5.2	Radiale Immundiffusion 36
3.6	Plasminogen 36
3.6.1	Nachweis mit chromogenem Substrat 37
3.6.2	Radiale Immundiffusion 39
3.7	Fibrin (-ogen) - Spaltprodukte (FDP) 39
3.8	Humanalbumin 40
3.9	Statistische Auswertung 42
KAPITEL 4:	
ERGEBNISSE	44
4.1	Quick und PTT 44
4.2	Humanalbumin 45
4.3	Fibrinogen 48
4.3.1	Gerinnbares Protein 48
4.3.2	Immunologisch bestimmtes Fibrinogen 50
4.3.3	Hitzepräzipitation 51
4.4	Fibrinopeptid A (FPA) 55
4.5	Antithrombin III (AT III) 58
4.5.1	Antithrombin III-Aktivität 58
4.5.2	Antithrombin III-Konzentration 59
4.6	Plasminogen 61
4.6.1	Funktionell bestimmtes Plasminogen 61
4.6.2	Immunologisch bestimmtes Plasminogen 65
4.7	Fibrin (-ogen)-Spaltprodukte (FDP) 68
4.8	Δ -Fibrinogen und seine Korrelation mit den FDP 70

	<u>Seite</u>
KAPITEL 5: DISKUSSION	72
KAPITEL 6: ZUSAMMENFASSUNG	82
LITERATURVERZEICHNIS	87

KAPITEL 1

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Neigung von Tumorpatienten zu Hyperkoagulopathien ist seit langem bekannt. Bereits 1865 berichtete Trousseau über ein gehäuftes Auftreten von Thrombosen bei Patienten mit malignen Erkrankungen (105). In der Folgezeit wurde dieses Phänomen im Sinne eines paraneoplastischen Syndroms von zahlreichen anderen Autoren bestätigt (63, 78, 99, 100).

Gelegentlich sind thrombotische Komplikationen das erste Anzeichen einer bis dahin unbemerkt gebliebenen malignen Erkrankung (25).

Tumorpatienten, auch mit klinisch unauffälligen Hämostaseparametern, zeigen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen unter Belastung eine größere Labilität ihres Gerinnungssystems und entwickeln in einem höheren Prozentsatz eine disseminierte intravaskuläre Gerinnung (DIC) (48,87).

Diese Verschiebung des hämostaseologischen Gleichgewichtes bei Tumorpatienten zugunsten der Koagulation ist insbesondere auch deshalb von Bedeutung, da gezeigt werden konnte, daß Hyperkoagulopathien mit vermehrten Fibrinablagerungen in der Mikrozirkulation die Metastasenbildung begünstigen (18, 92).

Der schrittweise Ablauf der Metastasenentstehung wurde in experimentellen Studien von Wood 1958 an Hasenohrkapillaren direkt beobachtet (111). Er konnte zei-

gen, daß am Kapillarendothel anhaftende Tumorzellen nur dann in das perivaskuläre Bindegewebe penetrieren können, wenn sie durch die Bildung eines Fibringerinnsels geschützt werden.

Ein progressives Wachstum im Extravaskulärraum kann nur mit Hilfe von Leitstrukturen aus Fibrin-Plättchen-Aggregaten erfolgen, die für die Vaskularisierung der entstehenden Metastasen nötig sind. Bei diesem Prozeß ist die Fixation der Tumorzellenemboli am Kapillarendothel ein entscheidender Schritt (52,106,111).

Endothelläsionen begünstigen das Anhaften der Tumorzellen (106), da sich diese bevorzugt an Basalmembranen und an freiliegendes Kollagen anlagern. Dabei spielen unter anderem Intimaverletzungen durch mechanische Traumata wie z.B. chirurgische Eingriffe (2) und die Entstehung einer lokalen Ischämie (2,92), wie es bei Störungen der Mikrozirkulation durch Tumorthrombenverschlüsse der Fall ist, eine Rolle. Mit der Größe der Tumorzellenemboli nimmt die Anzahl von Metastasen proportional zu (31,65). Dabei spielt die thromboplastische Aktivität der Tumorzellen eine wichtige Rolle (54).

Basierend auf diesen Erkenntnissen hat man versucht, durch Hemmung der Hyperkoagulabilität bzw. durch Stimulierung der fibrinolytischen Aktivität die Metastasenbildung zu reduzieren. So konnte durch Gabe von Urokinase während Operationen von Colon- und Rectumkarzinomen eine deutliche Verminderung der Metastasenbildung erreicht werden (109).

Wood gelang es, durch Gabe des defibrinierenden Schlangengiftes Arvin die Metastasierungsneigung effektiv zu

reduzieren (112). In einer Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen konnte die Anzahl induzierter Metastasen nach i.v.-Transplantation von Tumorzellen durch Heparin - oder Cumarinantikoagulation drastisch gesenkt werden (14,33,49,50,55,91).

An Patienten gibt es bisher nur wenige kontrollierte Studien (26,27,104). Gute Ergebnisse erzielten beispielsweise Thornes und Mitarbeiter bei der Antikoagulationbehandlung von 128 Tumorkranken. Durch zusätzliche Gabe von Warfarin zur Chemotherapie konnte die Zweijahres-Überlebensrate signifikant von 17,8 % auf 40,6 % erhöht werden (104). Allerdings liegen von anderer Seite auch widersprüchliche (47,77,115) oder ungünstige (24) Ergebnisse vor. Diese beruhen vermutlich auf dem unterschiedlichen Effekt der Antikoagulantien auf den Primärtumor und die beschriebene Metastasenbildung.

Die Prognose maligner Erkrankungen kann durch die operative Entfernung eines Tumors nur dann wesentlich verbessert werden, wenn es nicht bereits präoperativ zu einer Metastasierung gekommen ist und auch intraoperativ keine Mikrometastasierung stattfindet. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir daher, inwieweit intraoperativ bei Tumorkranken im Vergleich zu Kontrollpatienten Hämostaseveränderungen auftreten, durch die möglicherweise eine Mikrometastasierung begünstigt wird.

KAPITEL 2

PHYSIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Der Gerinnungsvorgang

2.1.1.1 Die vier Gerinnungsphasen

Die Blutgerinnung (siehe Abbildung 1) besteht aus einer Kette enzymatischer Reaktionen, deren Endstufe die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin darstellt. Der Ablauf kann schematisch in die folgenden vier Phasen unterteilt werden:

1. Vorphase: Bildung des Prothrombinaktivators

- a) über das Extrinsic-System, das bei Verletzung von Endothel- und Gewebszellen aktiviert wird und zur Freisetzung zellulärer Gewebefaktoren führt. Der wichtigste, das Gewebsthromboplastin (Faktor III), katalysiert zusammen mit Faktor VII und Ca^{++} die Aktivierung des Faktors X.
- b) über das Intrinsic-System, ausgelöst durch den Kontakt des Hagemann-Faktors (Faktor XII) mit negativ geladenen Oberflächen, wie z.B. Basalmembranen und Kollagen. An der Kontaktstelle kommt es einerseits zur Aktivierung des Faktors XII, andererseits zum Anhaften von Thrombozyten, die nach visköser Metamorphose Plättchenfaktor freisetzen. An der Aktivierung von Faktor X sind weiterhin die Faktoren XII, XI, IX, VIII und Ca^{++} beteiligt.

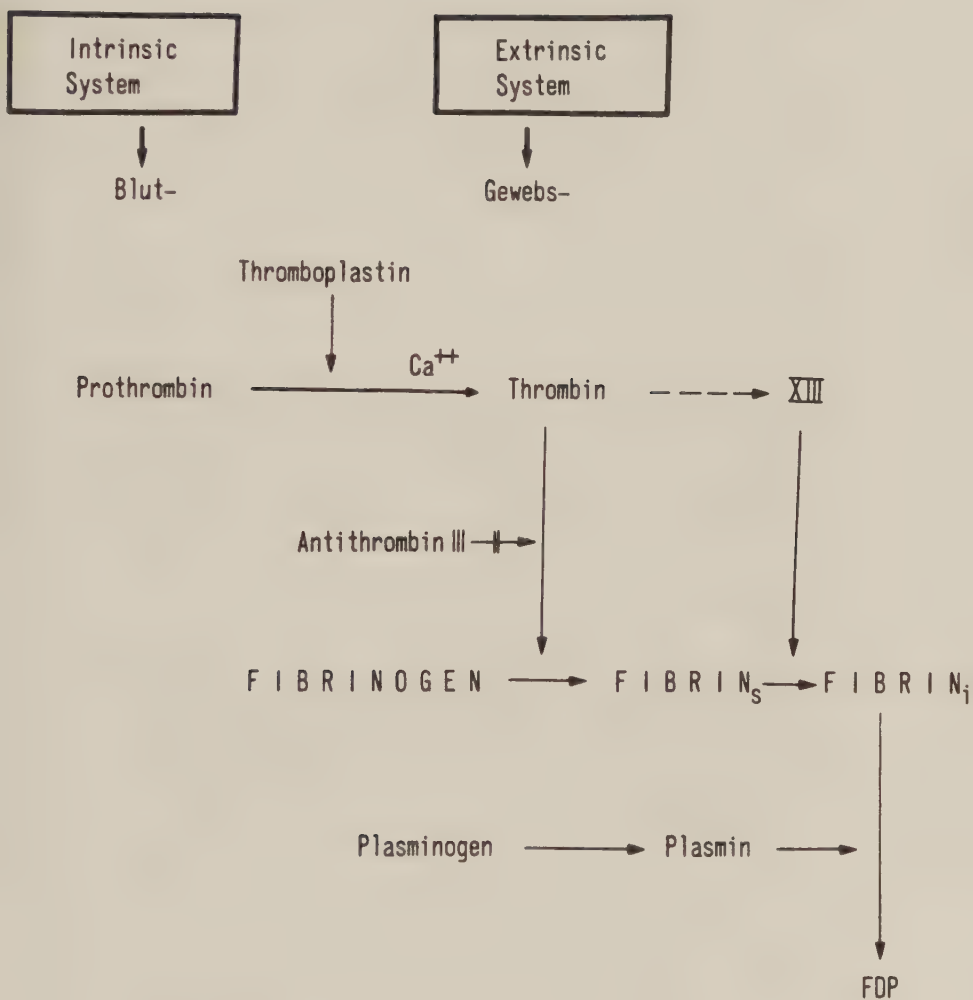


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Fibrinbildung und der Fibrinolyse

Gemeinsame Endstrecke beider Systeme ist die Aktivierung des Faktors X.

2. Erste Phase: Entstehung von Thrombin

Funktionstüchtiges Prothrombin wird in der Leber unter Mitwirkung von Vitamin K synthetisiert. Prothrombin wird in Anwesenheit von Ca^{++} zu Thrombin aktiviert.

3. Zweite Phase: Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin

Thrombin spaltet durch limitierte Proteolyse in einer hochspezifischen Reaktion nacheinander die Fibrinopeptide A und B vom N-terminalen Ende des Fibrinogenmoleküls ab (11). Bereits die Abspaltung der FPA-Moleküle, welche den ersten 16 Aminosäuren der beiden A-Ketten entsprechen, führt über nicht genau bekannte Mechanismen durch Freiwerden von Oberflächenrezeptoren zur Bildung von Fibrinmonomeren (8).

Diese können sich zu höhermolekularen Fibrinmonomerkomplexen zusammenlagern. Das so gebildete Fibrin ist in 8-molarer Urea noch löslich und wird deshalb als Fibrin-s bezeichnet. Erst unter dem Einfluß der Transglutaminase (Faktor XIII a) und Ca^{++} kommt es zur Quervernetzung des Fibrins. Diese erfolgt zunächst an den γ -, später auch an den α -Ketten. Dabei werden kovalente Bindungen zwischen den ϵ -Aminogruppen von Lysinresten mit den Amidgruppen von Glutaminresten am C-terminalen Ende der γ -Kette ausgebildet (76,90). So entsteht das dreidimensional vernetzte, harnstoffunlösliche Fbringerinnsel, Fibrin-i.

4. Nachphase: Retraktion des Gerinnsels

Im Anschluß an den Gerinnungsvorgang kommt es unter Beteiligung von Thrombosthenin, welches aus den Thrombozyten freigesetzt wird, zu einer konzentrischen Schrumpfung des Gerinnsels.

2.1.2 Antithrombin III und die Wirkungsweise von Heparin

Es gibt eine Reihe natürlicher Inhibitoren, die regulierend in das Gerinnungssystem eingreifen. Als wichtigster sei hier das Antithrombin III genannt, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 63 000 und einer Halbwertszeit von 17,5 bis 26,5 Stunden (103).

Seine Wirkung besteht vorwiegend in einer zeitabhängigen irreversiblen Inaktivierung von Thrombin (21) und Faktor Xa (7,113). In geringerem Maße werden auch die Faktoren VIIa, IXa, XIa und XIIa des Gerinnungssystems sowie Plasmin und Plasma-Kallikrein inhibiert. Heparin beschleunigt diese Reaktion erheblich (94). Wesentlich für die katalytische Wirkung von Heparin ist neben anderen Faktoren die Bildung eines Heparin-AT III-Komplexes (34, 68, 93).

2.1.3 Fibrinogen

2.1.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Fibrinogen und seine frühen Abbauprodukte sind der gerinnbare Anteil des Blutplasmas. Die Synthese von Fibrinogen erfolgt in der Leber. Die biologische Halbwertszeit beträgt je nach Bestimmungsmethode 2,5 bis 4 Tage. Es handelt sich um ein Glykoproteid mit einem Molekulargewicht von 34 000, das elektrophoretisch zwischen β - und γ -Globulinen wandert. Seine Konzentration im Plasma beträgt 200 bis 400 mg/dl (22).

Die Molekülstruktur wurde anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen dargestellt. Danach besteht das Fibrinogen aus einem langgestreckten Molekül mit einem mittleren und zwei endständigen kugelförmigen Bezirken, die durch dünne helikale Stränge von weniger als 15 Å miteinander verbunden sind (35, 40). Bei der Fibrinbildung lagern sich die Moleküle offenbar so aneinander, daß immer eine mittlere Kugel aus einem Molekül von zwei endständigen Kugeln der beiden Nachbarmoleküle umgeben ist. Mit Hilfe von optischen Beugungsmustern und elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergab sich für ein Fibrinogenmolekül eine Länge von 450 Å, der Durchmesser der äußeren Kugel beträgt 60 Å, derjenige der inneren 50 Å.

Fibrinogen ist gut löslich in physiologischen Medien wie verdünnten Salzlösungen. Durch Erwärmen auf 56 - 58° C kann es irreversibel ausgefällt werden. Das Fibrinpolymer ist im Gegensatz zum Fibrinogen nur löslich in Gegenwart hoher Konzentrationen an Harnstoff oder gewissen Salzen wie Natriumbromid (46).

Nach Einwirken von Faktor XIII wird es unlöslich. Zirkulierendes Fibrin wird vom Organismus rasch eliminiert. Nach Arbeiten von Müller-Berghaus und Mahn erfolgt die Elimination von radioaktiv markiertem Fibrin innerhalb von 6 Stunden (69).

2.1.3.2 Proteinstruktur

Das Fibrinogenmolekül ist aus drei dimeren Peptidketten $A\alpha$, $B\beta$ und γ aufgebaut. Daraus ergibt sich $(A\alpha, B\beta \text{ und } \gamma)_2$. Dabei charakterisiert A das Fibrinopeptid A und B das Fibrinopeptid B. Bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin werden beide Peptide durch Thrombin abgespalten, so daß Fibrin mit der Struktur $(\alpha, \beta, \gamma)_2$ entsteht. Die Einzelketten sind durch 29 Disulfidbrücken untereinander verknüpft (44).

Durch Anhäufung dieser Disulfidbrücken in bestimmten Molekülbereichen entstehen die charakteristischen Fibrin (-ogen)-Abbauprodukte D und E. Die vollständige Primärstruktur wurde in den letzten 15 Jahren aufgeklärt (45,66) (siehe hierzu Abbildung 2).

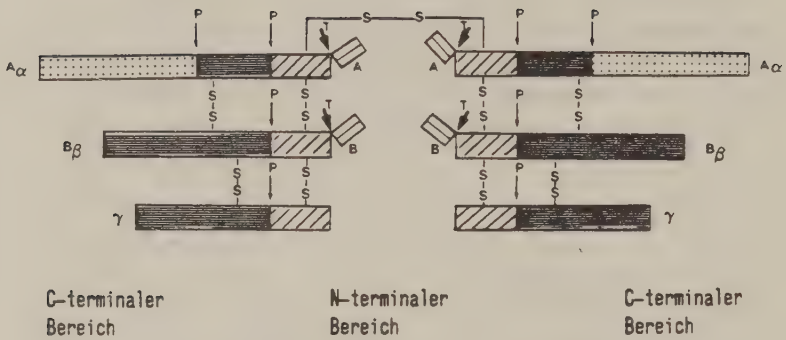


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Fibrinogenmoleküls in Anlehnung an A. Henschen (46)-

A und B stellen die Fibrinopeptide dar, die durch Thrombineinwirkung (T) freigesetzt werden. Die Pfeile kennzeichnen die Bezirke, in denen die Plasminspaltungen zu den charakteristischen Fibrinolyseprodukten führen. Das A-Fragment, welches zuerst abgetrennt wird, ist gepunktet, während das D-Fragment dunkel und das E-Fragment schräg schraffiert eingezeichnet sind.

2.1.3.3 Physiologische Bedeutung von Fibrinogen

Fibrinogen wird bei Auftreten von Endothelläsionen rasch in Fibrin umgewandelt und ermöglicht dadurch die Abdichtung von Gefäßdefekten.

Darüber hinaus kommt dem mit Hilfe des Fibrins gebildeten Gerinnsel eine weitere wichtige Rolle bei der Wundheilung zu. Die Fibrinfibrillen dienen im Rahmen der Wundheilung einsprossenden Zellen als Leitstruktur. Fibrin trägt damit zur Ausbildung eines Granulationsgewebes bei, durch welches der Defekt dann endgültig verschlossen wird (116). Bei fibrinösen entzündlichen Prozessen wird durch Fibrin das Entzündungsgebiet abgegrenzt, so daß eine Fibrinbarriere entsteht, durch welche die Erreger an ihrer freien Ausbreitung gehindert werden (41).

Schließlich deutet vieles darauf hin, daß Fibrinogen eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Metastasierung von Tumoren spielt. So entsteht nach Ansichten mancher Autoren das Stroma szirrhöser Tumoren aus der Organisation eines im Überfluß vorhandenen Fibringerüstes, ähnlich wie bei der Wundheilung (23). Die Fibrinfäden sollen als notwendige Leitschiene für den Eintritt von Kapillaren in den Tumor fungieren (59).

Schließlich kann die Fibrinhülle auch als Schutz des Tumors vor der körpereigenen Abwehr gesehen werden.

2.2 Die Fibrinolyse

Die Blutgerinnung ist ein ständig, wenn auch nur in geringem Maße ablaufender Prozeß. Dieser spontanen und kontinuierlichen Gerinnung (latente Gerinnung) steht die sogenannte latente Fibrinolyse gegenüber. In Analogie zum Gerinnungsvorgang wird das fibrinolytisch wirksame Plasmin durch Gewebe- oder Blutaktivatoren aus seiner Vorstufe, dem Plasminogen gebildet.

Die Aktivierung kann über zahlreiche physiologische und pharmakologische Aktivatoren erfolgen. Solche sind im Blut (Thrombocyten und Erythrocyten), aber auch in anderen Körperflüssigkeiten und Sekreten enthalten. Gewebseigene Aktivierungsstoffe findet man in hohen Konzentrationen in Uterus, Lungen, Prostata, Nebennieren und Lymphknoten (3).

Die Spaltung von Fibrinogen und Fibrin durch Plasmin erfolgt in mehreren Stufen, wobei Bruchstücke verschiedener Größe entstehen. (In Abbildung 2 sind die Plasminangriffspunkte durch Pfeile dargestellt.) Plasmin spaltet primär vom C-terminalen Ende der A-Kette ein größeres Bruchstück ab. Dabei fallen gleichzeitig weitere kleinere Peptide (A,B,C) an. Das so entstandene Molekül entspricht dem Fragment X mit einem Molekulargewicht von 24 000 und ist noch gerinnbar. Durch weitere Spaltungen entstehen aus dem X die Abbauprodukte Y und D, durch weiteren Abbau von Y wieder ein D und ein E-Fragment (75) (siehe Abbildung 3).

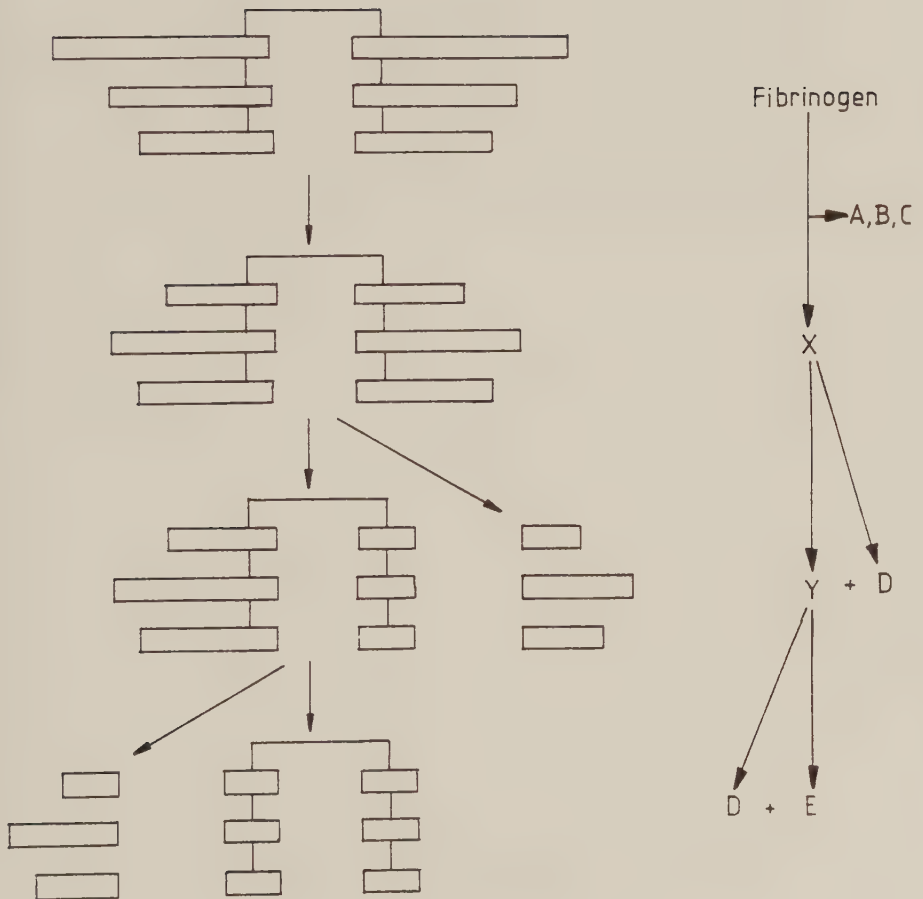


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Fibrinogenabbaues mit den charakteristischen Spaltprodukten X, Y, D und E.

Da bei der Fibrinolyse von quervernetztem Fibrin jeweils zwei D-Fragmente miteinander verknüpft sind, entsteht als Endabbauprodukt D - D und E. Der Nachweis von D - D bzw. seiner quervernetzten Kettenuntereinheit γ - γ z.B. mit elektrophoretischen Methoden belegt deshalb die Lyse quervernetzten Fibrins (60).

KAPITEL 3

METHODIK

3.1 Patientenkollektiv

Es wurde das Verhalten von Hämostaseparametern vor, während und nach der Operation von Tumorpatienten untersucht und mit den Werten einer Kontrollgruppe verglichen, deren Patienten aufgrund nicht maligner Erkrankungen operiert wurden.

Im einzelnen wurden untersucht:

1. Gruppe der Patienten mit malignen Erkrankungen

Gastrointestinale Operationen

Ösophagus-Carcinom	1
Magen-Carcinom	3
Rektum-Carcinom	3
Mamma-Carcinome	4
Bronchialcarcinome	3
Schilddrüsenkarzinome	2
n =	16

2. Kontrollgruppe mit Patienten mit nicht malignen Erkrankungen

Gastrointestinale Operationen

Gastrektomie bei ulcus ventriculi	3
--------------------------------------	---

Darmteilresektion bei Diverticulitis bzw. M.Crohn	4
Mammaoperationen	
Fibroadenome	2
Cyste	1
Lungenlappenresektion	1
Strumektomie bei Struma nodosa	2
Cholecystektomie bei Cholelithiasis	1
	n = 14

Beide Kollektive waren in Lebensalter, Art und Dauer des Eingriffes vergleichbar. Alle Patienten mit Ausnahme einer Patientin mit Mamma-Carcinom und zwei Patientinnen mit Fibroadenom der Mamma erhielten am Tag der Operation und in den darauffolgenden Tagen die übliche "Low-dose"-Heparinisierung von 3 x 5000 IE Heparin/Tag.

3.2 Blutabnahme und Verarbeitung der Blutproben

Die Blutentnahmen erfolgten zu folgenden fünf Meßzeitpunkten:

1. Am Abend vor der Operation
2. Eine Stunde nach Beginn der Operation

3. Drei Stunden nach Beginn der Operation
4. Einen Tag nach der Operation
5. Acht Tage nach der Operation

Bei zwei Patienten des Tumorkollektives und fünf Patienten des Kontrollkollektives lag die Operationsdauer unter drei Stunden, so daß zum Meßzeitpunkt 3 kein Blut mehr abgenommen wurde. Bei diesen Patienten entfiel auch die Entnahme nach acht Tagen, da sie bereits am sechsten oder siebenten postoperativen Tag entlassen werden konnten.

Für die im folgenden beschriebenen immunologischen Bestimmungsmethoden sowie für die funktionelle Bestimmung von AT III und Plasminogen wurden Proben mittels Citrat enthaltender Blutentnahmeröhrchen (Mischungsverhältnis 1 : 10) gewonnen. Die übrigen Untersuchungen erfolgten aus Blutproben, die mit einem speziellen Antikoagulans im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden. Es handelte sich hierbei um ein Citrat-EDTA-Trasylo1-Gemisch⁽⁺⁾ zur

(+) Antikoagulantienlösung (pH 7,4)

- 0,129 m tri-Na-Citrat (Merck, p.a. Nr. 6448)
- 0,06 m TES (Tris- (hydroxymethyl) - methyl - 2 - aminoäthan - Sulfonsäure) (Serva, p.a. Nr. 37199)
- 0,05 m EDTA (Merck, p.a. Nr. 8418)
- 4000 KIE/ml Trasylol (Bayer Leverkusen / T 653)

vollständigen Hemmung proteolytischer Aktivitäten. Hierzu wird in 10 ml Einmalspritzen 1 ml der Antikoagulantienlösung vorgelegt.

Nach einwandfreier Venenpunktion und Verwerfen der ersten Blutropfen zieht man Blut blasenfrei bis zur 10 ml-Marke auf. Durch mehrmaliges Kippen erfolgt eine gleichmäßige Durchmischung. Unmittelbar nach der Entnahme werden die Proben bei ca. 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und das so gewonnene Plasma bis zur weiteren Verarbeitung in kleinen Portionen bei -40°C eingefroren.

3.3 Fibrinogen

3.3.1 Gerinnbares Protein

Die Bestimmung des gerinnbaren Proteins erfolgte in Anlehnung an Blombäck (10), in einer Modifikation nach Hafter und Graeff (39), durch Ausfällen mit Thrombin. Diese Methode erfaßt die drei Fibrinogenanteile K 300, K 320 und K 340 sowie den größten Teil von x. Bei den Fibrinogenanteilen K 300 und K 320 handelt es sich um Fraktionen, bei denen bereits ein geringer Abbau an der α -Kette stattgefunden hat.

Material

- Calciumchlorid (0,025 mol/l)

- Aprotinin (Trasylol, Bayer Leverkusen)
- Topostasin (Hoffmann-La Roche)
- NaCl 0,9 %
- alkalische Harnstofflösung 40 % (400 g Harnstoff + 100 ml 2n NaOH ad 1000 ml aqua bidest.)
- Wasserbad (37° C)
- Pipetten
- Photometer⁽⁺⁾
- Plastikhäkchen (Behring)

Testdurchführung

Die Ansätze mit je 0,5 ml Plasma, 0,2 ml CaCl_2 , 0,2 ml Trasylol (2000 IE) und 0,1 ml Topostasin (60 IE) werden nach kräftigem Durchmischen für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt durch die Thrombineinwirkung die Polymerisation zu einem gallertigen Gerinnsel.

Dieses Gerinnsel wird mit Hilfe eines Plastikhäkchens entnommen und nach sorgfältigem Ausdrücken am Rande des Reagenzglases für 10 bis 20 Minuten in isotone Kochsalzlösung überführt. Nach diesem Waschvorgang bringt man den Clott in 5 ml der beschriebenen alkalischen Harnstofflösung, in der er sich wieder auflöst. Nach etwa einer Stunde wird die durch das gelöste Fibrin entstandene Trübung photometrisch gegen eine Blindlösung in Quarzküvetten gemessen.

(+) Beckman Spektralphotometer Mod. 35

Auswertung

Der Anteil des gerinnbaren Proteins im Plasma ergibt sich aus der Differenz der Extinktionswerte bei 280 nm und 325 nm und berechnet sich wie folgt:

$$(1) \quad \frac{\text{gerinnbares Protein (mg/dl)}}{100} = \frac{a}{b} \times \Delta E ;$$

wobei: $a = 1,1$ (Korrekturfaktor zur Kompensation der Verdünnung der Blutprobe durch Antikoagulans)

$b = 15,9$ (Spezifisch molarer Extinktionskoeffizient für Fibrinogen in alkalischer Harnstofflösung)

Hieraus errechnet sich

$$(2) \quad \frac{\text{gerinnbares Protein (mg/dl)}}{100} = 6,918 \times \Delta E ;$$

Das nach Entfernung des Gerinnsels zurückbleibende Serum wurde anschließend für die Durchführung des Staphylokokken-Clumping-Testes eingesetzt.

3.3.2 Radiale Immundiffusion

Die immunologische Bestimmung des Fibrinogens wurde mit Hilfe der radialen Immundiffusion nach Mancini (70)

durchgeführt. Es wurden Nor-Partigenplatten der Firma Behring verwendet.

Grundsätzlich bietet sich durch kombinierte enzymatische und immunologische Bestimmung eines Proteins die Möglichkeit, zwischen einem Mangelzustand und einer funktionellen Abnormität zu unterscheiden. Allerdings ist zu beachten, daß mit dem immunologischen Verfahren für Fibrinogen auch sämtliche Fibrin (ogen)-Abbauprodukte miterfaßt werden, so daß die ermittelten Werte zu hoch liegen können.

Testprinzip

Die käuflichen Immundiffusionsplatten enthalten in einer Agargelschicht ein gegen das zu untersuchende Protein gerichtetes Antiserum. Die antigenhaltige Probe (Patientenplasma) wird in die ausgestanzten Auftragepositionen gegeben und diffundiert in den Agar. Dort, wo sich eine der konstanten Antiserumkonzentration äquivalente Antigenkonzentration befindet, bildet sich ein Präzipitatring aus, dessen quadrierter Durchmesser zur eingebrachten Antigenmenge proportional ist.

Material

- Partigenplatten (Fa. Behring)
- Dispenser für 5 µl (Fa. Behring)

- Ablesegerät⁽⁺⁾
- Isotone Kochsalzlösung
- Pipetten
- Kontroll- und Standardplasmen

Vorbereitung

Die Platten bleiben vor dem Beschicken etwa fünf Minuten offen stehen, damit eventuell in die Auftragsstellen eingedrungenes Kondenswasser verdunstet. Die Standardplasmen werden im Verhältnis 1 : 2 und 1 : 4 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt; Kontroll- und Patientenplasmen sind unverdünnt einzusetzen.

Testdurchführung

Mit Hilfe des Dispensers gibt man jeweils 5 µl Standardplasma (100 %, 50 %, 25 %), Kontrollplasmen und Probeplasma in die Mitte der einzelnen Auftragsstellen, ohne dabei die Agarschicht zu verletzen. Nachdem die Probenflüssigkeit in die Agarschicht eingedrungen ist, werden die Platten wieder fest verschlossen und bis zum Ausdiffundieren (2-5 Tage) bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Ausmessen der Präzipitatsdurchmesser erfolgt am Meßprojektor, der ein sehr genaues Ablesen ermöglicht.

(+) Meßprojektor für Immunanalysen der Fa. Behring.

Auswertung

Man trägt die quadrierten Durchmesser (in mm^2) der Standardpräzipitate als Funktion der Standardkonzentrationen (in mg/dl) auf linearem Millimeterpapier auf und ermittelt dann über die so erhaltene Bezugsgerade die Konzentrationen der Probeplasmen. Für Fibrinogen beträgt die übliche Schwankungsbreite 200 bis 450 mg/dl .

3.3.3 Hitzepräzipitation

Bei der Hitze-fällung wird Plasma auf 56°C erhitzt. Dabei fallen Fibrin und die Fibrinogenbruchstücke X und Y sowie ein Teil der Fragmente D und E aus. Die kleineren α -Kettenfragmente A, B und C sind nicht hitzestabil und bleiben in Lösung.

Bereits 1955 beschrieb Schulz eine Methode zur Hitze-fibrinbestimmung (98). Dieses Verfahren wurde von uns weitgehend modifiziert. So bestimmten wir das Hitze-fibrin nicht, wie von Schulz vorgeschlagen, durch Ablesen der Niederschlagsmenge nach Zentrifugieren in graduieren Nisselröhrchen - was nur eine vergleichsweise ungenaue Aussage gestattet - sondern anhand einer photometrischen Trübungsmessung.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Material

- Phosphatpuffer pH 6,35 (0,15 m NaCl = 8,7 g/l und 0,05 m Na-Phosphat = 1,37 g/l in 1 l aqua bidest.)

- Wasserbad mit Thermostat für 60° C
- Photometer⁽⁺⁾
- Pipetten

Testdurchführung

0,5 ml Plasma werden mit 4,5 ml Phosphatpuffer pH 6,35 vermischt. Die Extinktion dieser Mischung bei 405 nm wird gegen Phosphatpuffer als Leerwert ermittelt. Anschließend inkubiert man die Proben für 10 Minuten im Wasserbad auf 60° C und mißt danach die Extinktion bei 405 nm gegen den Leerwert.

Auswertung

Die Differenz der Extinktionswerte vor und nach Inkubation ergibt ΔE . Um eine Korrelation dieser Bestimmungsmethode mit den Ergebnissen der Thrombinfällung und der radialen Immundiffusion zu zeigen, wurden die

ΔE der einzelnen Proben in Nomogrammen gegen die entsprechenden Fibrinogenwerte der Thrombinfällung und der radialen Immundiffusion aufgetragen (siehe Ergebnisteil).

Legt man durch die so erhaltene Punktwolke eine Ausgleichsgerade, kann anhand der Geradengleichung von ΔE auf die entsprechende Fibrinogenkonzentration umgerechnet werden. Aus dem Vergleich mit den Werten der Thrombinfällung ergibt sich dabei folgende Formel:

(+) Beckman Spektralphotometer, Modell 35.

$$(3) \quad \begin{array}{l} \text{Fibrinogen-} \\ \text{konzentration (mg/dl)} \end{array} = 385 \times \Delta E - 82$$

Setzt man die ΔE in Beziehung zu den entsprechenden Ergebnissen der radialen Immundiffusion, erhält man die Formel:

$$(4) \quad \begin{array}{l} \text{Fibrinogen-} \\ \text{konzentration (mg/dl)} \end{array} = 476 \times \Delta E - 106$$

aus der sich eine höhere Fibrinogenkonzentration für ein bestimmtes ΔE berechnet, entsprechend der in diese Formel mit eingeflossenen Fibrin (-ogen)-Spaltprodukte.

3.4 FPA-Bestimmung

Fibrinopeptid A wurde radioimmunologisch nach der Bentonit-Methode mittels eines kommerziell erhältlichen Testkits der Firma Byk-Mallinckrodt gemessen. Dieser 1971 von Nossel entwickelte Radio-Immun-Essay (83,84), der in seiner ursprünglichen Form für den klinischen Gebrauch zu aufwendig war, kommt hier in einer Modifikation nach Kockum (56,57) zur Anwendung.

Die Entfernung störender Plasmaproteine und die Abtrennung von Fibrin/Fibrinogenspaltprodukten mittels Bentonitfällung ersetzt die zeit- und arbeitsaufwendigen Trennschritte wie Äthanol-fällung und Geladsorption an Anionenaustauscher.

Diese waren von W. Schramm und Mitarbeitern als bereits erhebliche Verbesserung der vorher durchgeführten Dialyse entwickelt worden. Eine weitere Verbesserung brachte die Präzipitation des Antigen-Antikörperkomplexes mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, an Stelle der früher geübten Aktivkohleadsorption ("Charcoaltechnique"), die den ersten Antikörper weniger spezifisch und unter wesentlich größerem Zeitaufwand fällte (97).

Testprinzip

Die mit Bentonit vorbehandelten Plasmaproben werden mit ^{125}J -markiertem Fibrinopeptid A versetzt, welches dann im ersten Reaktionsschritt mit dem im Plasma vorhandenen unmarkierten FPA um die Bindungsstellen des zugesetzten spezifischen Antikörpers konkurriert. Als Ergebnis dieser Konkurrenz nimmt die Radioaktivität des Antigen-Antikörperkomplexes in gleicher Weise ab, wie die Konzentration der unmarkierten, nachzuweisenden FPAs zunimmt.

Das an den Antikörper gebundene ^{125}J -FPA wird dann mit Hilfe einer zweiten Antikörper-Polyethylenglycol-lösung von überschüssigem freiem ^{125}J -FPA abgetrennt und die Aktivität mit einem γ -Szintillationszähler bestimmt.

Die Plasmakonzentration von FPA wird über eine Standardkurve ermittelt, die aus mitgelieferten Standards erstellt wird.

Reagenzien

Der Test-Kit enthält folgende Reagenzien:

- ^{125}J -FPA mit einer Gesamtaktivität von 370 kBq $\approx$ 10 μCi ; in einer Pufferlösung, die Cyclohexamid und Chloramphenicol als Konservierungsmittel enthält.
- FPA-Standards in BSA-Puffer in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 20, 40 ng FPA / ml. Konservierungsmittel wie oben.
- FPA-Antiserum vom Kaninchen in einer Pufferlösung von 1 : 100. Konservierungsmittel wie oben.
- 2. Antikörper - Polyethylen - Glycol - Lösung bestehend aus:
6,5 % PEG und präzipitierenden Anti-Kaninchenkörper 1 : 10 in Pufferlösung. Konservierungsmittel: Thiomersal.
- Bentonit-Suspension in stabilisierter gepufferter Proteinelösung mit Cyclohexamid und Chloramphenicol als Konservierungsmittel.
- Non-specific-Binding (NSB) Pufferlösung zur Bestimmung der unspezifischen Bindung. Konservierungsmittel Cyclohexamid und Chloramphenicol.
- Lyophilisiertes Antikoagulans mit einem Thrombininhibitor, EDTA und Aprotinin. Anstelle dieses Antikoagulans wurde das in 3.2 beschriebene Antikoagulans verwendet.

- FPA-Kontrollreagenzien mit normalem und erhöhtem FPA-Gehalt:
 Kontrolle A: Aktivitätsbereich 0,9 bis 1,7 ng/ml
 Kontrolle B: Aktivitätsbereich 6,2 bis 9,0 ng/ml.

Notwendige Laborgeräte

- Teströhrchen 12 x 75 mm aus Polypropylen, Polyäthylen oder Polystyren.
- Pipetten mit einem Einfüllvolumen von 100, 200 und 1000 μ l
- Gammaszintillationszähler⁽⁺⁾
- Vibrationsmischer
- Zentrifuge mit mindestens 1000 x g

Vorbehandlung der Proben

Je 500 μ l der Plasmaproben werden mit 1 ml Bentonit-suspension, die zuvor kräftig gemischt wurde, versetzt und mittels Vibrationsmischer durchmischt. Anschließend werden die Röhrchen 30 Minuten bei mehr als 1000 x g zentrifugiert, danach die Überstände vorsichtig ohne Aspiration von Bentonit-Partikeln abgehebert und in neue Röhrchen überführt. Standards und Kontrollen werden nicht mit der Bentonit-Suspension vorbehandelt!

(+) Liquid Szintillationszähler Packard TRI CARB

Zur Kontrolle einer effektiven Bentonit-Vorbehandlung und zur Bestimmung eigener Referenzwerte untersuchten wir Plasmen von Kontrollpersonen in gleicher Weise wie die Patientenproben mit.

Die Überstände der Proben der Meßzeitpunkte 2 - 5 wurden im Verhältnis 1 : 2 mit 50 mmol Trispufferlösung pH 7,5 verdünnt, da FPA-Werte über der Nachweisgrenze von 40 ng/ml erwartet wurden.

Testdurchführung

Nach Erwärmen aller Testkomponenten auf Zimmertemperatur pipettiert man in Doppelansätzen zu jeweils 200 μ l Plasma 100 μ l 125 J-FPA und mischt beides vorsichtig durch.

Anschließend wird in ununterbrochener zeitlicher Reihenfolge in jedes Ansatzröhrchen 100 μ l FPA-Antiserum zugegeben und mittels Vibrationsmischer kräftig durchmischt. Dann werden die Röhrchen mit Parafilm abgedeckt und für 40 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Aufschütteln der 2. Antikörper-PEG-Lösung setzt man jedem Röhrchen 1 ml hiervon zu und durchmischt kräftig mittels Vibrationsmischer. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 1000 x g, nach der die Überstände in Spezialbehälter für radioaktiven Abfall zu dekantieren sind.

Zur restlosen Entfernung von nicht gebundenem 125 J-FPA bleiben die Teströhrchen für etwa 15 Minuten mit der

Öffnung nach unten auf Fließpapier stehen, wonach eventuell an den Gefäßwänden noch vorhandene Tropfen mit Watteträgern entfernt werden. Danach erfolgt die Bestimmung der Restaktivität im Gammaszintillationszähler.

Auswertung über die Standardkurve

Zu jeder Serie von Plasmabestimmungen muß eine Standardkurve erstellt werden. Die Standards mit den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 40 ng/ml sind in gleicher Weise zu behandeln wie die Patientenproben.

Von den gemessenen Counts aller Standard- und Probenlösungen (B) wird als erstes der Nullwert (N) entsprechend der unspezifischen Aktivität abgezogen. Diesen ermittelt man durch Zusatz von NSB-Puffer anstelle des FPA-Antiserums zum Nullstandard. Die so ermittelte Differenz (B - N) wird dann in Prozent der Zählrate des Nullstandards ($B_0 - N$) umgerechnet.

Die Zählrate des Nullstandards entspricht der Maximalbindung von ^{125}J -FPA bei nicht vorhandenem unmarkierten FPA. Diese Prozentaktivitätswerte:

$$\frac{B - N}{B_0 - N}$$

geben den Anteil von gebundenem ^{125}J -FPA in Anwesenheit von FPA in der Plasmaprobe wieder. Die Standardkurve ergibt sich durch Auftragen der Prozentaktivitätswerte der einzelnen Standards auf den linearen Achsenabschnitt von semilogarithmischen Millimeterpapier.

Aus dieser sind die Konzentrationen der Proben abzulesen. Die von uns ermittelten Normalwerte lagen mit 0 - 6 ng/ml über den in der Literatur angegebenen Werten, was auf die Verwendung unserer speziellen Antikoagulantienlösung zurückzuführen ist.

Fehlerquellen

Zum Erzielen verwertbarer Ergebnisse ist die korrekte Blutentnahme bei optimaler Venenpunktion Voraussetzung, da durch inadäquate Abnahmetechnik falsch hohe Werte bestimmt werden. Plasma, welches nicht am selben Tag untersucht werden kann, muß bei -15°C oder weniger eingefroren werden.

Eine weitere Fehlerquelle besteht in einer unzureichenden Bentonitfällung und in einer unvollständigen Abtrennung von nicht gebundenem ^{125}J -FPA. Die exakte Durchführung der Methode ist durch ständig mitgeführte Kontrollproben zu überwachen; die Präzision wird durch mitgeführtes Poolplasma kontrolliert.

3.5 Antithrombin III (AT III)

Prinzipiell kann die Bestimmung von AT III mit funktionellen und immunologischen Methoden erfolgen. Zum funktionellen Nachweis von AT III standen bis zur Einführung der synthetischen chromogenen Substrate nur Gerinnungstests zur Verfügung, die in mancherlei Hin-

sicht fragwürdige Ergebnisse lieferten.

So mußte beispielsweise das Plasma defibriniert werden, was entweder durch Erhitzen auf 56°C oder mittels eines defibrinierenden Enzyms wie Reptilase erfolgte. Durch das Erhitzen vermindert sich jedoch die AT III-Aktivität um bis zu 30 % (29).

Heute basieren die meisten in der Routine durchgeführten Methoden auf der Anwendung chromogener Substrate (30).

Die immunologischen Verfahren (wie z.B. die radiale Immundiffusion, Laurell-Methode) sind sehr spezifisch, ergeben jedoch nicht immer biologisch relevante Werte, da nur das Antigen, nicht aber die Funktion des AT III-Moleküls, gemessen wird. Abweichungen in den Ergebnissen beider Methoden können somit Hinweise auf das Vorhandensein von funktionell inaktivem AT III liefern, weshalb wir beide Methoden einander gegenüberstellten.

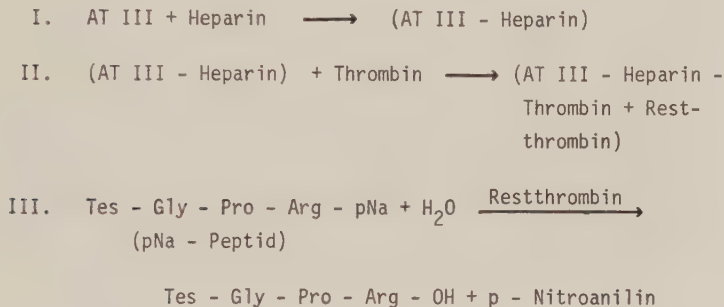
3.5.1 Bestimmung mit chromogenem Substrat

Die von uns durchgeführte Bestimmung der AT III-Aktivität mit Test-Kits der Firma Boehringer Mannheim ist eine Modifikation nach Abildgaard (1) und erfolgte aus Citratplasma.

Testprinzip

Durch Heparin aktiviertes AT III wird zunächst mit

einer definierten Menge Thrombin versetzt. Nach einer festgelegten Inkubationszeit bestimmt man die Menge an Restenzym (nicht gebundenes Thrombin) mit Hilfe eines chromogenen Substrates:



Durch den Heparinzusatz wird die Inaktivierung von Thrombin wesentlich beschleunigt, so daß nur noch geringe Inkubationszeiten nötig sind. Außerdem wird der Test dadurch spezifisch.

Reagenzien

- Pufferkonzentrat: Tris-HCl 100 mmol/l pH 8,1
 Heparin 1,75 USP-Einheiten/ml
 Aprotinin 6,5 IU / ml
 NaCl 150 mmol/l
- Thrombin: 0,5 U / ml
- Chromozym TH (Tes - Gly - Pro - Arg - pNa • AcOH)
 1,9 mmol/l

Die Reagenzien werden mit destilliertem Wasser gelöst und sind dann bei 4° C bis zu einem Monat haltbar. Eine Mischung aus Pufferkonzentratlösung und Thrombinlösung im Verhältnis 41 : 1 ergibt das Reaktionsgemisch.

Material

- Wasserbad mit Thermostat (37° C)
- Pipetten mit einem Einfüllvolumen von 0,1; 0,2; 1 und 2 ml
- Photometer⁽⁺⁾
- Stoppuhr
- Destilliertes Wasser
- NaCl 0,9 % und 20 %-ige Essigsäurelösung

Probenvorbereitung

Zunächst muß eine Plasmaverdünnung von 1 Teil Plasma und 100 Teilen 0,9 %-iger NaCl-Lösung hergestellt werden.

Testdurchführung

Die Bestimmung erfolgte bei 37° C als Zweipunktmessung.

Zu 100 µl der verdünnten Plasmaprobe gibt man 2 ml des

(+)

Reaktionsgemisches, vermischt beides und inkubiert für 5 Minuten bei 37⁰ C. Dann werden jedem Ansatzröhrchen 200 µl der Chromozymlösung zugegeben und sofort durchmischt.

Nach genau 2 Minuten (Stoppuhr!) stoppt man die Reaktion durch Zusatz von je 1 ml 20 %-ige Essigsäure. Alle Ansätze erfolgten als Doppelbestimmungen. Zu jeder Meßserie wurden 3 Thrombinleerwerte mitgeführt, die anstelle der Probe 100 µl 0,9 %-iges NaCl enthielten. Die Überprüfung der Richtigkeit der Methode geschah durch Mitbestimmung von Kontrollplasmen mit Konzentrationen im normalen und pathologischen Bereich.

Auswertung

Die Extinktionen sind innerhalb von 60 Minuten bei 405 nm abzulesen. Die Extinktionsdifferenz ΔE ermittelt sich aus der Extinktion des Thrombinleerwertes abzüglich der Extinktion der Probe:

$$E_{AT\ III} = E_{TL} - E_{Probe}$$

Die AT III-Konzentration berechnet sich dann wie folgt⁽⁺⁾:

$$\begin{aligned} (5) \quad AT\ III\text{-Konzentration (IU / ml)}_{37^0\ C} &= \\ &= 171,5 \times \Delta E_{AT\ III} \end{aligned}$$

(+) Siehe Beipackzettel des Testkits von Boehringer Mannheim.

Der Normalbereich für die Bestimmung bei 37⁰ C liegt bei 20 - 29 IU / ml, entsprechend 80 - 120 %.

3.5.2 Radiale Immundiffusion

Die immunologische AT III-Bestimmung erfolgte mittels der radialen Immundiffusion nach Mancini (70) auf M-Partigenplatten der Firma Behring. Zur Durchführung und Auswertung siehe 3.3.2. Die Normalwerte liegen zwischen 20 und 30 mg/dl entsprechend 80 bis 120 % der Norm.

3.6 Plasminogen

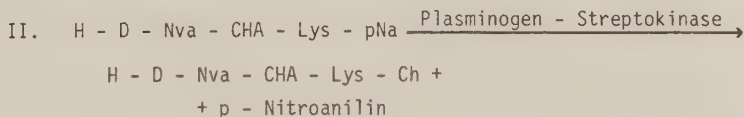
Analog zum Antithrombin III erfolgte auch die Bestimmung von Plasminogen nach einer funktionellen Methode unter Verwendung eines chromogenen Substrates (61) und nach der radialen Immundiffusion. Auch hier gilt, daß die immunologischen Methoden keinen Hinweis auf die biologische Aktivität geben und auch keine Unterscheidung zwischen Plasminogen und Plasmin gestatten, weshalb sie mit entsprechenden enzymatischen Methoden kombiniert werden sollten.

3.6.1 Nachweis mit chromogenem Substrat

Die Plasminogenaktivitäts-Bestimmung im Citratplasma wurde mit dem Berichrom^(R) - Plasminogen - Testkit von Behring nach der Zweipunktmethode bei 37° C durchgeführt.

Testprinzip

Das in der Probe enthaltene Plasminogen wird durch im Überschuß vorgelegte Streptokinase in einen Komplex überführt, dessen aktives Zentrum in der nachfolgenden enzymatischen Reaktion das chromogene Substrat spaltet.



Reagenzien

- Streptokinase-Reagens: 0.1 mol/l pH 7,5
- Substrat-Reagens (H - D - Nva - CHA - Lys - pNa)
3 mmol/l

Material

- Wasserbad mit Thermostat (37° C)
- Pipetten mit einem Einfüllvolumen von 0,02; 0,1; 0,5 und 1 ml.
- Photometer⁽⁺⁾
- Stoppuhr
- destilliertes Wasser
- NaCl 0,9 % und 20 %-ige Essigsäure

Die Auflösung der Reagenzien erfolgt in der angegebenen Menge destilliertem Wasser. Vor Gebrauch sind die Lösungen auf 37° C zu erwärmen.

Testdurchführung

Je 0,02 ml der unverdünnten Plasmaproben werden im Doppelansatz mit je 1 ml Streptokinase-Reagenz vermischt und während 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Dann startet man die enzymatische Reaktion durch Zugabe von je 0,1 ml Substrat-Reagenz und stoppt diese nach genau zwei Minuten (Stoppuhr!) mit jeweils 0,05 ml 20 %-iger Essigsäure.

Zu jeder Probe wird ein Probenleerwert mitgeführt, der anstelle des Streptokinaseragenz isotone Kochsalzlösung enthält. Zur Richtigkeitskontrolle wurden Kontrollplasmen mit Werten im normalen und pathologischen Bereich mitgeführt.

(+) Beckmann Spektralphotometer Modell 35

Auswertung

Innerhalb von 60 Minuten ermittelt man die Extinktionen der Proben gegenüber den Probenleerwerten bei 405 nm. Der Gehalt an Plasminogen in Prozent der Norm entspricht dann der Extinktion der Proben multipliziert mit einem Faktor, welcher von der gewählten Meßtemperatur abhängt; bei 37° C beträgt dieser 261. Als normal gelten Werte zwischen 80 und 120 % der Norm.

3.6.2 Radiale Immundiffusion

Die Bestimmung der Plasminogenkonzentration nach der radialen Immundiffusion (70) auf M-Partigenplatten (Firma Behring) wurde wie unter 3.3.2 vorgenommen. Die normale Variationsbreite beträgt 6 bis 25 mg/dl.

3.7 Fibrin (-ogen)-Spaltprodukte (FDP)

Die Ermittlung der FDP erfolgte mit dem Staphylokokken-Clumping-Test (SCT) (42) unter Verwendung von "FSP-Testbesteck" der Firma Behring.

Dieser Test beruht auf der Agglutination bestimmter Staphylokokkenstämme in Gegenwart von Fibrinogen, Fibrinmonomeren und der Spaltprodukte X und Y, wodurch ein makroskopisch sichtbares Präzipitat entsteht. Mit

Hilfe einer Serumverdünnungsreihe ist eine annähernde Titerangabe möglich. Der Test wurde von uns insofern modifiziert, als wir das bei der Thrombinfällung entstandene Serum verwendeten.

Nach geometrischer Verdünnung des Serums auf den mitgelieferten Testplatten und Zugabe der gleichen Menge der Staphylokokkensuspension wird beides mit einem Rührstäbchen durchmischt und für zwei Minuten vorsichtig rotiert. Der Titer entspricht der höchsten Verdünnung, die noch eine positive Verklumpungsreaktion ergibt.

In unserem Fall mußte im Ergebnis die bei der Thrombinfällung entstandene Vorverdünnung des Serums von 1 : 2 berücksichtigt werden. Die Konzentration an FDP in $\mu\text{g/ml}$ ergibt sich durch Multiplikation der Titerstufen mit $10^{(+)}$. Normalerweise zeigt auch unverdünntes Serum eine negative Reaktion als Ausdruck einer FDP-Konzentration unter der Nachweisgrenze.

3.8 Humanalbumin

Die Bestimmung der Humanalbuminkonzentration wurde vorgenommen, um den Verdünnungsfaktor zu ermitteln, der

(+) Siehe Beipackzettel des "FSP-Testbesteckes".

aus der oft beträchtlichen intra- und postoperativen Flüssigkeitssubstitution resultiert. So korrigieren wir die Werte zu den Meßzeitpunkten 2 - 4 für Fibrinogen, FPA, FDP und Plasminogen auf folgende Weise:

$$(6) \quad X_{\text{real}}(t) = \frac{X_{\text{gemessen}}(t) \times 100}{(\%) \text{ Humanalbumin}(t)}$$

wobei: $X_{\text{real}}(t)$ = Wert nach Berücksichtigung der Verdünnung zum Meßzeitpunkt t .

$X_{\text{gemessen}}(t)$ = Gemessener Wert zum Zeitpunkt t .

$(\%) \text{ Humanalbumin}(t)$ = Humanalbuminkonzentration zum Zeitpunkt t in Prozent des Ausgangswertes.

Nach acht Tagen erreichten die Humanalbuminwerte annähernd die Ausgangskonzentrationen, weshalb zu diesem Zeitpunkt eine Korrektur nicht mehr nötig war. Da für die enzymatische Wirkung von AT III die tatsächliche Konzentration im Plasma ausschlaggebend ist, entfiel für diesen Wert eine Korrektur.

Testdurchführung

Die Humanalbuminkonzentration wurde analog zur immunologischen AT III und Plasminogenbestimmung mit Hilfe der radialen Immundiffusion (70) ermittelt. Zur Anwendung kamen M-Partigenplatten der Firma Behring. Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie unter 3.3.2

beschrieben mit der Annahme, daß die Probe- und Kontrollplasmen in einer Verdünnung von 1 : 10 in die Auftragstellen einzufüllen waren.

3.9 Statistische Auswertung

Zunächst wurden die Mittelwerte ($\bar{X}$) und die Standardabweichungen (SD) der Meßergebnisse beider Patientenkollektive zu den verschiedenen Meßzeitpunkten berechnet und daraus die Verlaufskurven erstellt.

Ziel der statistischen Auswertung war es nachzuweisen, ob sich während des Beobachtungszeitraumes sowohl bei den Tumorpatienten als auch bei den Patienten mit nicht malignen Grunderkrankungen signifikante Unterschiede in Bezug auf die Ausgangswerte nachweisen lassen und ob signifikante Niveauunterschiede zwischen beiden Gruppen bestehen. Die Längsschnittstudie erfolgte mit dem "Wilcoxon Matched - Pairs signed - Ranks Test" für verbundene Stichproben⁽⁺⁾.

Dabei wurde den Ausgangswerten gegenübergestellt:

1. Als Ausdruck der operativen Belastung die Werte zum Meßzeitpunkt 3.

(+) HP (Hewlett Packard) Tischrechner 9862 a.

2. Die Werte zum Meßzeitpunkt 5, da diese den Grad der postoperativen Erholung widerspiegeln.

Um Niveauunterschiede zu testen, errechneten wir - nach einem von Lehman und Lienert vorgeschlagenen Verfahren (62) - zu jeder Kurve einen Schätzer $\bar{X}_{ki}$, der das Niveau der Kurve charakterisiert. In unserem Fall war dies der Mittelwert der fünf Meßwerte der einzelnen Patienten beider Kollektive.

Auf die so erhaltenen zwei Stichproben von Schätzern wurde dann der nicht parametrische U-Test nach Mann-Whitney für unverbundene Stichproben⁽⁺⁾ angewendet. P-Werte $> 0,05$, d.h. Irrtumswahrscheinlichkeiten über 5 % wurden als nicht signifikant angesehen.

(+) HP (Hewlett Packard) Tischrechner 9862 a.

KAPITEL 4

ERGEBNISSE

4.1 Quick und PTT

Die präoperativ routinemäßig bestimmten Hämostaseparameter Quick und PTT lagen mit einer Ausnahme bei allen Patienten im Normbereich (vergleiche Tabelle 1).

Quick [%]	Quick [%]	PTT [sec]	PTT [sec]
TU n = 16	Ø TU n = 14	TU n = 16	Ø TU n = 14
75	100	28	36
65	120	35	34
80	100	31	34
100	80	36	32
85	95	48	31
80	95	33	35
90	100	28	30
90	90	29	32
80	90	30	38
100	95	33	32
85	100	33	32
90	100	35	32
80	100	28	36
100	90	31	34
100		33	
80		29	
86,25	96,8	32,5	33,4

Tabelle 1: Quick und PTT der Tumorpatienten (TU) und der Vergleichspatienten (Ø TU) vor der Operation. Die letzte Zeile enthält die Mittelwerte der jeweiligen Spalten.

Lediglich bei einem der Tumorpatienten fand sich bei normalem Quickwert eine verlängerte partielle Thromboplastinzeit von 48 Sekunden.

4.2 Humanalbumin

Wie aus dem Kurvenverlauf in Abbildung 3 ersichtlich ist, kam es während der Operation bei beiden Patientenkollektiven zu einem signifikanten Abfall ($p < 0,05$) der Humanalbuminwerte.

Bereits am nächsten Tag stiegen die Werte wieder an und erreichten nach acht Tagen annähernd die Ausgangskonzentrationen. Obwohl bei dem Tumorkollektiv der Abfall des Humanalbumins etwas ausgeprägter war, ergaben sich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (vergleiche Tabelle 2).

So erreichten die Tumorpatienten nach dreistündiger Operationsbelastung einen Wert von 75,5 % des Ausgangswertes gegenüber 79,6 % bei den Vergleichspatienten. Dementsprechend erfolgte auch der postoperative Wiederanstieg leicht verzögert. Da offensichtlich die intraoperative Flüssigkeitssubstitution zu einem relativen Abfall der Plasmaproteine führt, korrigierten wir die Werte für Fibrinogen, Plasminogen, FPA und FDP um den entsprechenden Verdünnungsfaktor, wie unter 3.8 beschrieben. Durch dieses Vorgehen wurden Fehler durch unterschiedliche Flüssigkeitssubstitutionen in beiden Kollektiven eliminiert.

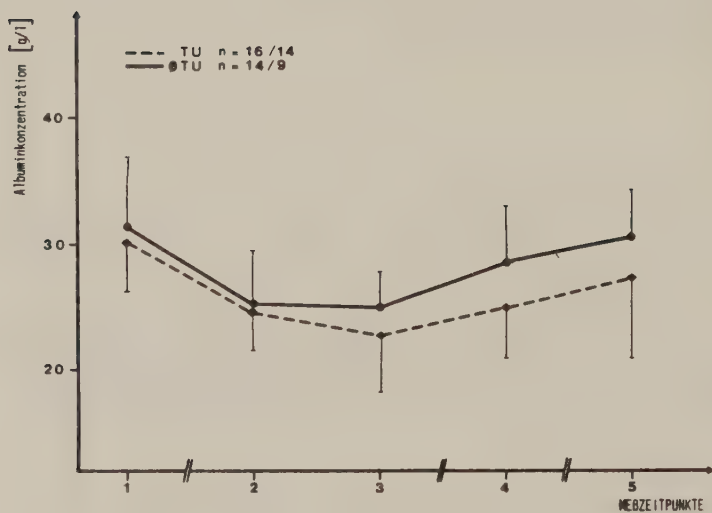


Abbildung 3: Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufes der durchschnittlichen Humanalbuminkonzentrationen im Plasma und der Standardabweichungen bei Tumorkranken (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU).

Meßzeitpunkte		1	2	3	4		5		
		TU: n=16 Ø TU: n=14	TU: n=16 Ø TU: n=14	TU: n=14 Ø TU: n=9	p 1geg-5	TU: n=16 Ø TU: n=14	TU: n=14 Ø TU: n=9	p 1geg-5	p TU geg-ØTU
Fibrinogen [mg/dl]	TU	350 ± 121	338 ± 123	300 ± 123	n.s.	404 ± 135	465 ± 135	p < 0,05	p < 0,05
	Ø TU	285 ± 60	277 ± 57	271 ± 49	n.s.	347 ± 69	454 ± 79	p < 0,01	
Fibrinogen [mg/dl] (immunol.)	TU	429 ± 236	425 ± 149	405 ± 164	n.s.	540 ± 176	607 ± 118	p < 0,05	p < 0,05
	Ø TU	344 ± 68	338 ± 68	360 ± 86	n.s.	430 ± 91	559 ± 123	p < 0,01	
Albumin [g/l]	TU	30,2 ± 3,9	24,5 ± 2,8	22,8 ± 4,5	p < 0,05	24,9 ± 3,9	27,3 ± 6,2	n.s.	n.s.
	Ø TU	31,4 ± 4,5	26,2 ± 3,2	25 ± 2,9	p < 0,05	28,6 ± 4,5	30,5 ± 3,8	n.s.	

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fibrinogen- und Albumin-Konzentrationen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU). Die Signifikanzniveaus der Längsschnittstudie sind in den Spalten 3 und 5 angegeben; die Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollpatienten nach Spalte 5.

4.3 Fibrinogen

4.3.1 Gerinnbares Protein

Die Ausgangswerte (zum Meßzeitpunkt 1) des durch Thrombinfällung ermittelten gerinnbaren Proteins lagen bei den Tumorpatienten mit 350 ± 121 mg/dl deutlich über den Werten der Vergleichspatienten mit 285 ± 60 mg/dl (siehe Tabelle 2).

Da die Werte der Vergleichspatienten im Mittel lediglich um 14 mg/dl abgefallen waren, während bei den Tumorpatienten eine Differenz von 50 mg/dl gegenüber den Ausgangswerten zu verzeichnen war, kam es unter der Operation zu einer Annäherung beider Kollektive (siehe Abbildung 4).

Nimmt man ein mittleres Plasmavolumen von 4000 ml pro Patient an, so bedeutet das, daß beim Tumorpatienten unter einer dreistündigen operativen Belastung zwei Gramm Fibrinogen gegenüber 0,56 Gramm bei den Kontrollpatienten umgesetzt wurden. Postoperativ kam es bei beiden Patientengruppen zu einem hyperkompensatorischen Anstieg des gerinnbaren Fibrinogens, so daß die Werte nach acht Tagen (zum Meßzeitpunkt 5) signifikant höher lagen als die Ausgangswerte ($p < 0,05$ bei Tumorpatienten bzw. $p < 0,01$ bei den Vergleichspatienten).

Im Niveauvergleich beider Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$.

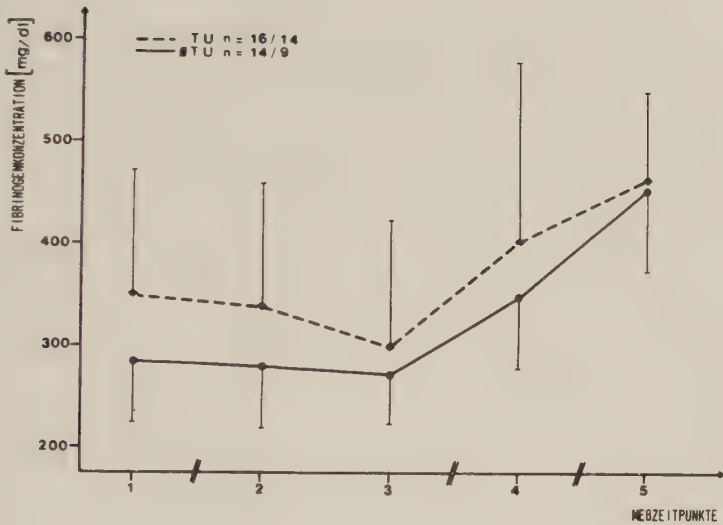


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der mittels Thrombinfällung ermittelten durchschnittlichen Fibrinogenkonzentrationen und deren Standardabweichungen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU).

4.3.2 Immunologisch bestimmtes Fibrinogen

Die mittels radialer Immundiffusion bestimmten Werte für Fibrinogen zeigten intraoperativ den gleichen Verlauf wie die Werte der Thrombinfällung (siehe Abbildung 5). Postoperativ stiegen sie stärker an. Dies deutet auf das Miterfassen der Fibrin (-ogen)-Spaltprodukte hin.

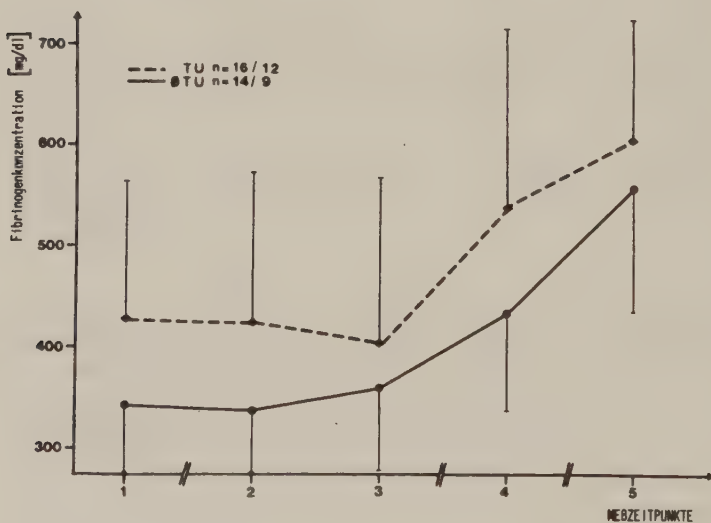


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der immunologisch bestimmten Fibrinogenkonzentrationen und der Standardabweichung bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU).

Bei den Tumorpatienten ist der Anstieg mit 176 mg/dl gegenüber den Ausgangswerten um 63 mg/dl höher als bei der Thrombinfällung (Anstieg um 115 mg/dl). Bei den Vergleichspatienten beträgt der Unterschied 46 mg/dl.

Dieser Mehranstieg kann als Ausdruck der postoperativ zunehmenden Spaltprodukte (vergleiche 4.7) gewertet werden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Fibrinogenkonzentrationen zu den jeweiligen Meßzeitpunkten können der Tabelle 2 entnommen werden.

4.3.3 Hitzepräzipitation

Um aus den bei der Hitzepräzipitation ermittelten Extinktionswerten ΔE die Fibrinogenkonzentrationen berechnen zu können, wurde ΔE gegen die mit Hilfe der Thrombinfällung ermittelten Fibrinogenkonzentrationen aufgetragen (siehe Abbildung 6).

Der Vergleich von 121 Wertepaaren ergab eine enge Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,94. Die Steigung der Ausgleichsgeraden betrug 0,0021, der Intercept 0,2216. Die unter 3.3.3 beschriebene Methode der Hitzepräzipitation liefert somit der Bestimmung mittels Thrombinfällung vergleichbare quantitative Fibrinogenwerte.

Ihr Vorteil liegt in dem geringen zeitlichen und materiellen Aufwand:

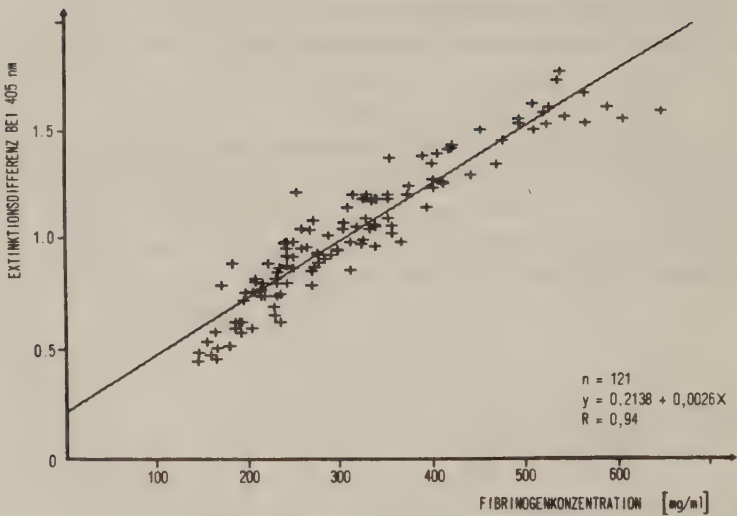


Abbildung 6: Korrelation zwischen den Extinktionsdifferenzen ΔE bei 405 nm vor und nach Hitzepräzipitation und den entsprechenden Fibrinogenkonzentrationswerten, die durch Thrombinfällung ermittelt wurden.

Die Durchführung einer Bestimmung dauert höchstens 20 Minuten im Vergleich zur Thrombinfällung, die zumindest 90 Minuten in Anspruch nimmt. Anstelle eines Spektralphotometers und Quarzküvetten für Absorptionsmessungen im UV-Bereich reichen ein einfaches Spektrallinienphotometer und Glasküvetten. Auch die Anschaffung des relativ teuren Thrombins entfällt.

Löst man die Gleichung der Ausgleichsgeraden nach X auf, so erhält man die Formel zur Umrechnung von ΔE auf die Fibrinogenkonzentration:

$$(3) \quad \begin{array}{l} \text{Fibrinogen -} \\ \text{konzentration (mg/dl)} \end{array} = 385 \times \Delta E - 82$$

Analog zur Thrombinfällung beinhaltet die so ermittelte Fibrinogenkonzentration außer Fibrinogen im allgemeinen nur das noch gerinnbare Spaltprodukt X, während die auch hitzefällbaren Umsatzprodukte Y und D nur bei sehr hohen Konzentrationen durch ein größeres ΔE zu falsch hohen Werten führen.

Wie Abbildung 7 zeigt, besteht ebenfalls eine hohe Korrelation zwischen den ΔE -Werten und den entsprechenden Ergebnissen der radialen Immundiffusion. Der Korrelationskoeffizient beträgt auch hier 0,94. Zur Umrechnung von ΔE auf die Fibrinogenkonzentration ergibt sich aus der hier dargestellten Ausgleichsgeraden die Formel:

$$(4) \quad \begin{array}{l} \text{Fibrinogen-} \\ \text{konzentration (mg/dl)} \end{array} = 476 \times \Delta E - 106$$

Wählt man zur Umrechnung diese Formel, so erhält man für das gleiche ΔE einen höheren Wert als durch Anwendung von Formel (3), da hier auch die Spaltprodukte berücksichtigt sind.

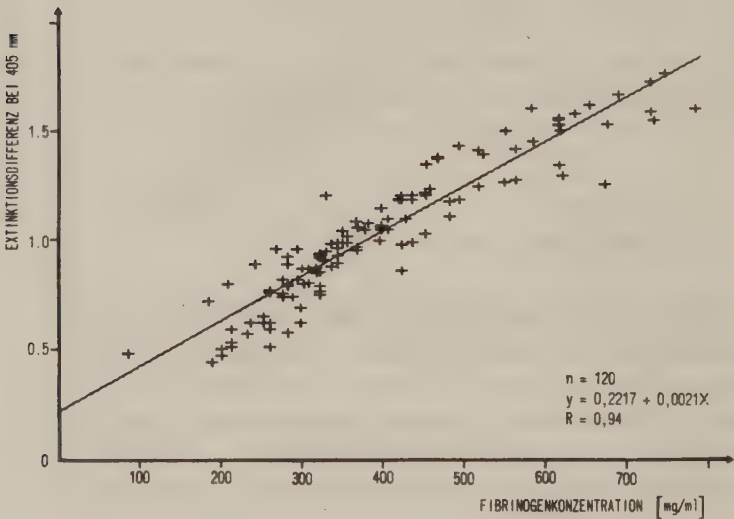


Abbildung 7: Korrelation zwischen den Extinktionsdifferenzen ΔE bei 405 nm vor und nach Hitzepräzipitation und den mittels radieller Immundiffusion bestimmten zugehörigen Fibrinogenkonzentrationswerten.

4.4 Fibrinopeptid A (FPA)

Präoperativ waren die FPA-Konzentrationen der Tumorpatienten mit 11,6 ng/ml doppelt so hoch wie die der Vergleichspatienten mit 5,5 ng/ml (siehe Abbildung 8).

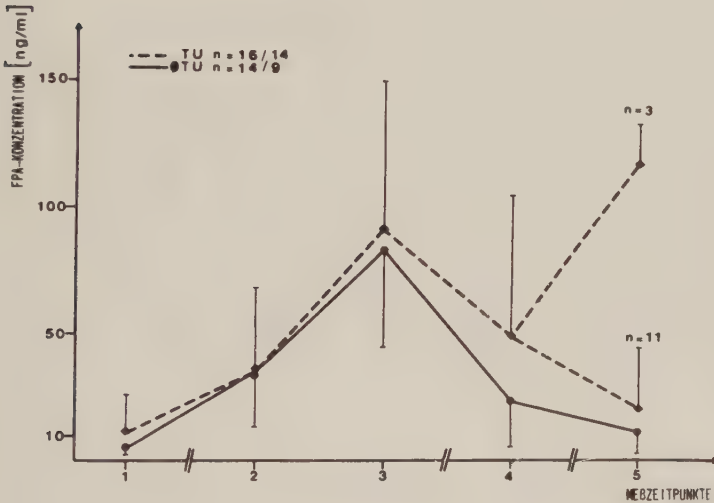


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Fibrinopeptid A-Konzentrationen im Plasma und deren Standardabweichungen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU). Die drei Patienten, die zum Meßzeitpunkt 5 einen steilen Wiederanstieg der FPA-Werte zeigten, sind gesondert aufgeführt.

Im Verlauf der Operationen stiegen sie in beiden Kollektiven signifikant an und erreichten nach drei Stunden im Tumorkollektiv mit $91,2 \pm 58,4$ ng/ml ($p < 0,001$) und im Kontrollkollektiv mit $82,7 \pm 37,8$ ng/ml ($p < 0,01$) ihre höchsten Werte (vergleiche Tabelle 3). Postoperativ fielen die FPA-Konzentrationen in beiden Kollektiven wieder ab.

Drei der Tumorpatienten zeigten zwischen dem ersten und achten Tag nach der Operation einen erneuten Anstieg des FPA auf durchschnittlich 117,3 ng/ml und wurden daher getrennt aufgeführt. Läßt man die Werte dieser drei Patienten unberücksichtigt, so lagen auch die FPA-Konzentrationen der Tumorpatienten nach einer Woche nicht mehr signifikant über den Ausgangswerten.

Die Verlaufskurven beider Patientengruppen zeigten einen ausgeprägten Niveauunterschied mit $p < 0,002$.

Meßzeitpunkte		1	2	3	4	5		
		III: n=16 pIV: n=14	III: n=16 pIV: n=14	III: n=14 pIV: n=9	p 1999,3	III: n=16 pIV: n=14	III: n=14 pIV: n=9	p 1999,5
FPA [ng/ml]	TU	11,4 ± 14,4	35,5 ± 33	91,2 ± 58,4	p < 0,001	49,7 ± 55,2	21,7 ± 22,8	n.s.
	Ø TU	5,5 ± 3,3	34,3 ± 20,6	82,7 ± 37,8	p < 0,01	23,2 ± 18	11,1 ± 8,4	n.s.
								p < 0,002
AT III [%] (funkt.)	TU	74,6 ± 16,2	54,2 ± 17,5	44,9 ± 13,9	p < 0,001	56,4 ± 17,1	73,3 ± 21,1	n.s.
	Ø TU	87,2 ± 17	66,3 ± 15,7	56 ± 17,6	p < 0,01	72,4 ± 15,3	85,8 ± 22,9	n.s.
								p < 0,05
AT III [%] (immunol.)	TU	102,2 ± 11,3	86,3 ± 6,2	80,6 ± 8,1	p < 0,001	91,9 ± 9,7	94,6 ± 10,9	p < 0,05
	Ø TU	101,6 ± 13,8	87,5 ± 9,4	84 ± 9,1	p < 0,05	92,5 ± 10,3	101,6 ± 9,4	n.s.
								n.s.

Tabelle 3:

Mittelwerte und Standardabweichungen der FPA- und AT III-Konzentrationen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU). Die Signifikanzniveaus der Längsschnittstudie sind in den Spalten 3 und 5 angegeben; die Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollpatienten nach Spalte 5.

4.5 Antithrombin III (AT III)

4.5.1 Antithrombin III-Aktivität

Zwischen den beiden Patientenkollektiven fanden sich schon präoperativ deutliche Unterschiede der AT III-Aktivitätswerte. Die Tumorkranken lagen mit $74,6 \pm 16,2 \%$ bereits im pathologischen Bereich (siehe Abbildung 9).

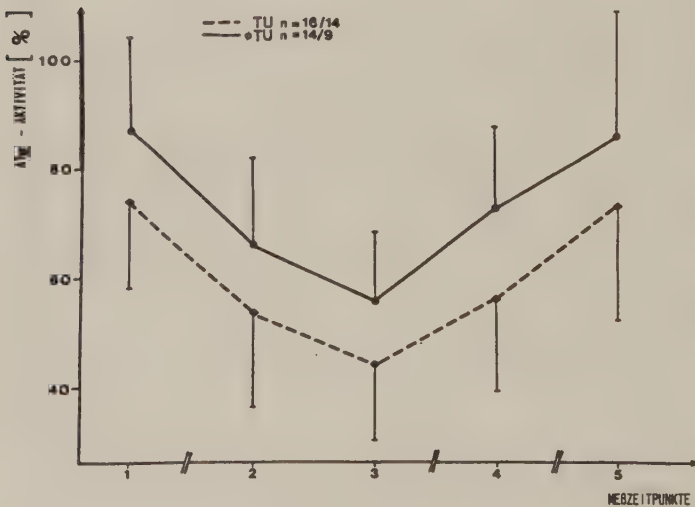


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Antithrombin III-Aktivität (funktionsell bestimmtes AT III) und deren Standardabweichungen bei Tumorkranken (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU).

Im Verlauf der Operationen kam es bei beiden Kollektiven zu einem nahezu parallelen Abfall der AT III-Aktivität, so daß, entsprechend der bereits erniedrigten Ausgangswerte, die Werte der Tumorpatienten bis auf $44,9 \pm 13,9 \%$, die der Vergleichspatienten auf $56 \pm 17,6 \%$ abfielen (siehe Tabelle 3).

Der intraoperative Abfall war auf einem hohen Niveau signifikant mit $p < 0,001$ für die Tumorpatienten und $p < 0,01$ für die Vergleichspatienten. Am ersten postoperativen Tag zeigten beide Patientengruppen bereits eine deutliche Erholung ihrer AT III-Aktivität und zum Meßzeitpunkt 5 waren die Ausgangswerte wieder erreicht.

Die zu allen Meßzeitpunkten deutlich niedrigeren Werte der Tumorpatienten spiegeln sich im unterschiedlichen Niveau beider Kurven wieder mit $p < 0,05$.

4.5.2 Antithrombin III-Konzentration

Die immunologisch bestimmten AT III-Werte zeigten im Vergleich zu den Ergebnissen der funktionellen Methode keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Kollektiven (siehe Abbildung 10). Vom gleichen Niveau ausgehend, fielen die Werte der Tumorpatienten nach dreistündiger Operationsdauer etwas stärker ab als die der Vergleichspatienten, wobei die Differenz auch zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeprägt war.

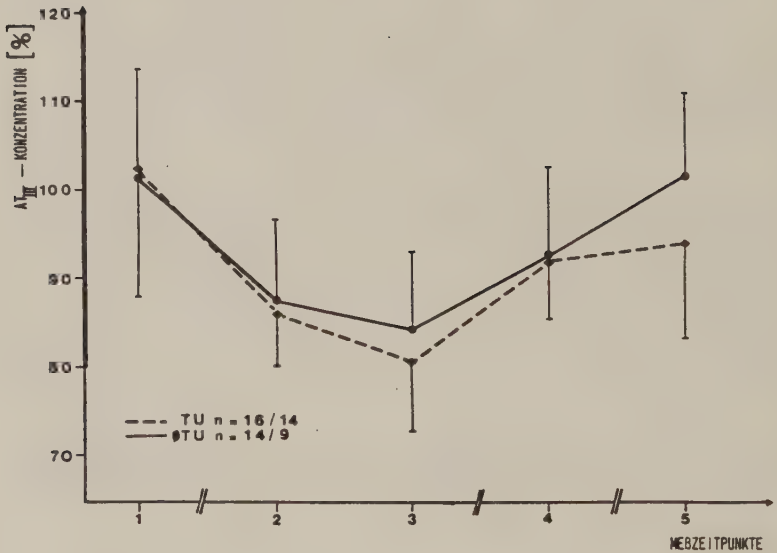


Abbildung 10: Zeitlicher Ablauf der immunologisch bestimmten Antithrombin III-Konzentrationen (Durchschnittswerte) und der Standardabweichungen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU).

Nur zum Meßzeitpunkt 5 lagen deutlichere Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor, da der Wiederanstieg bei den Tumorpatienten verzögert verlief, so daß deren Endwerte immer noch signifikant niedriger lagen als die Ausgangswerte ($p < 0,05$).

Alle bestimmten AT III-Werte lagen im Normbereich. Dabei bestanden zwischen Tumor- und Kontrollpatienten keine signifikanten Unterschiede.

4.6 Plasminogen

4.6.1 Funktionell bestimmtes Plasminogen

Die Werte beider Patientengruppen sind in Abbildung 11 wiedergegeben. In beiden Patientenkollektiven lagen die Plasminogen-Konzentrationen präoperativ im Normbereich. Intraoperativ war sowohl bei der Tumorgruppe als auch bei der Vergleichsgruppe ein signifikanter Abfall ($p < 0,01$) bis in den pathologischen Bereich zu verzeichnen.

So erreichten die Tumorpatienten zum Meßzeitpunkt 3 einen Wert von $61 \pm 11 \%$, die Kontrollpatienten einen Wert von $64 \pm 13 \%$ (siehe Tabelle 4).

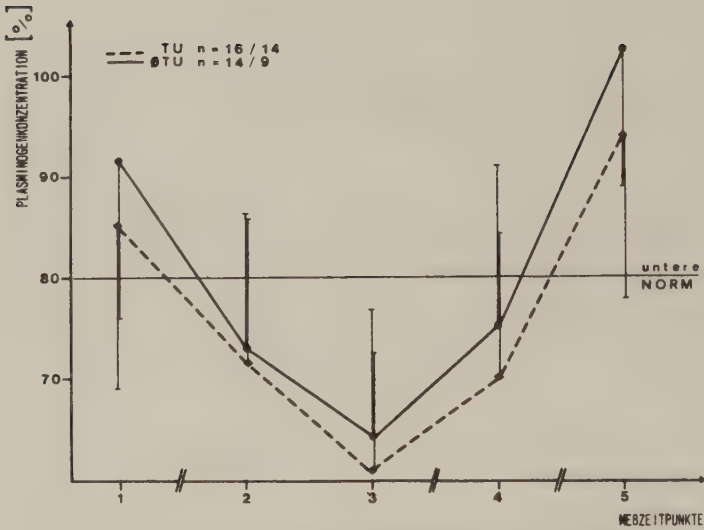


Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf der durchschnittlichen Plasminogenkonzentrationen (funktionell bestimmtes Plasminogen) und deren Standardabweichungen ohne Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU). Vergleiche Abbildung 12.

Messzeitpunkte		1	2	3		4	5		
		TU: n=16 Ø TU: n=14	TU: n=16 Ø TU: n=14	TU: n=14 Ø TU: n=9	p 1 geg.-5	TU: n=16 Ø TU: n=14	TU: n=14 Ø TU: n=9	p 1 geg.-5	F TU geg.-Ø TU
Plasminogen [$\frac{\%}{\%}$]	TU	85 ± 16	72 ± 14	61 ± 11	p < 0,01	70 ± 14	94 ± 16	n.s.	n.s.
	Ø TU	91 ± 15	73 ± 13	64 ± 13	p < 0,01	75 ± 16	103 ± 14	n.s.	
Plasminogen [mg/dl]	TU	11 ± 2	8,7 ± 1,6	7,6 ± 1,5	p < 0,01	8,7 ± 2,2	11,9 ± 2,3	n.s.	n.s.
	Ø TU	11 ± 2,5	9,2 ± 2	7,7 ± 1,1	p < 0,01	9 ± 1,7	13,6 ± 1,8	n.s.	
FDP [γ g/ml]	TU	34 ± 41	36 ± 30	46 ± 45	n.s.	62 ± 52	80 ± 56	p < 0,05	p < 0,002
	Ø TU	4 ± 8,5	7 ± 12,4	15 ± 18	n.s.	17 ± 18	24 ± 13	p < 0,01	
Δ -Fibrinogen [mg/ml]	TU	79 ± 36	87 ± 50	105 ± 57	n.s.	122 ± 54	122 ± 54	p < 0,01	p < 0,05
	Ø TU	59 ± 25	69 ± 21	93 ± 54	n.s.	80 ± 44	104 ± 52	p < 0,05	

Tabelle 4:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Plasminogen- und FDP-Konzentrationen sowie der Differenzwerte Δ -Fibrinogen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU). Die Signifikanzniveaus der Längsschnittstudie sind in den Spalten 3 und 5 angegeben; die Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen Tumor- und Kontrollpatienten nach Spalte 5.

Korrigiert man diese Werte um den Verdünnungsfaktor, so läßt sich erkennen, daß der intraoperativ erfolgte Abfall der Plasminogen-Konzentrationen weitgehend auf den Verdünnungseffekt zurückzuführen ist (siehe Abbildung 12).

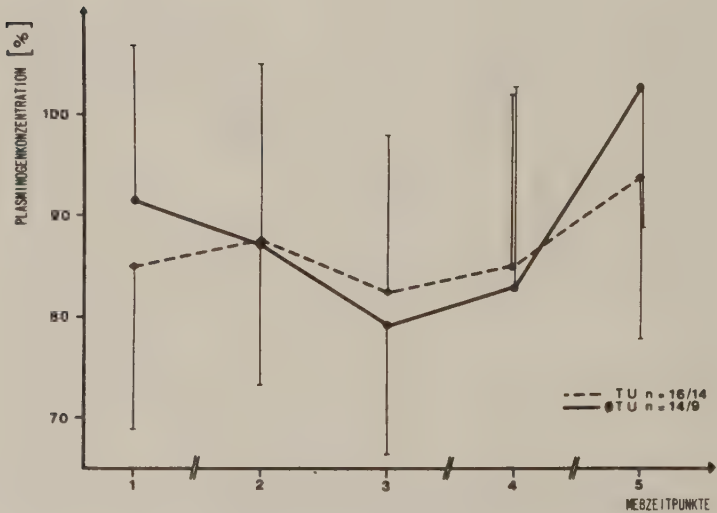


Abbildung 12: Im Gegensatz zu Abbildung 11 zeigen diese Kurven den Verlauf der korrigierten Durchschnittswerte und Standardabweichungen des funktionell bestimmten Plasminogens bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten ($\emptyset$ TU).

Ein Wiederanstieg der Werte erfolgte vom ersten postoperativen Tag an. In beiden Gruppen lagen die Werte zum Meßzeitpunkt 5 über den Ausgangswerten. Zwischen den beiden Kollektiven bestand kein signifikanter Niveauunterschied.

4.6.2 Immunologisch bestimmtes Plasminogen

Sowohl die korrigierten wie die unkorrigierten Werte für das immunologisch bestimmte Plasminogen lagen immer im Normbereich (siehe Abbildungen 13 und 14). Analog zum AT III bestand auch hier keine Differenz in den Ausgangswerten zwischen Tumorpatienten und Vergleichspatienten. Auch im weiteren Verlauf unterschieden sich beide Patientenkollektive nur unwesentlich.

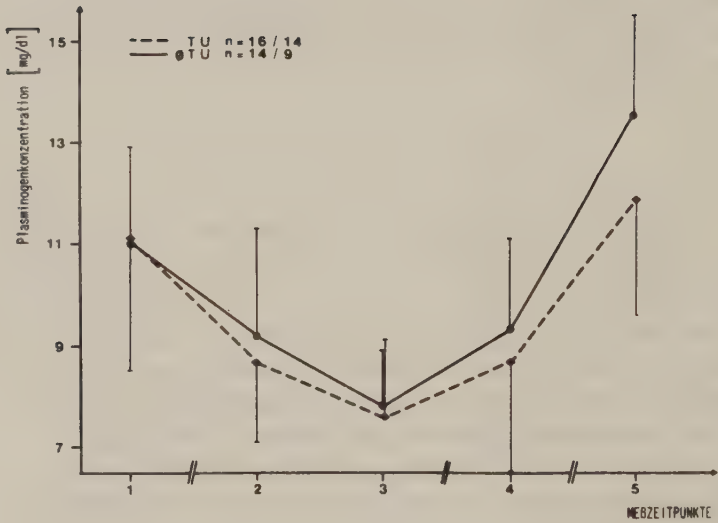


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Plasminogen-Konzentrationen und deren Standardabweichungen (immunologisch bestimmtes Plasminogen) ohne Berücksichtigung der Verdünnung bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU). Die untere Normgrenze (6 mg/dl) wird von beiden Patientengruppen nicht unterschritten.

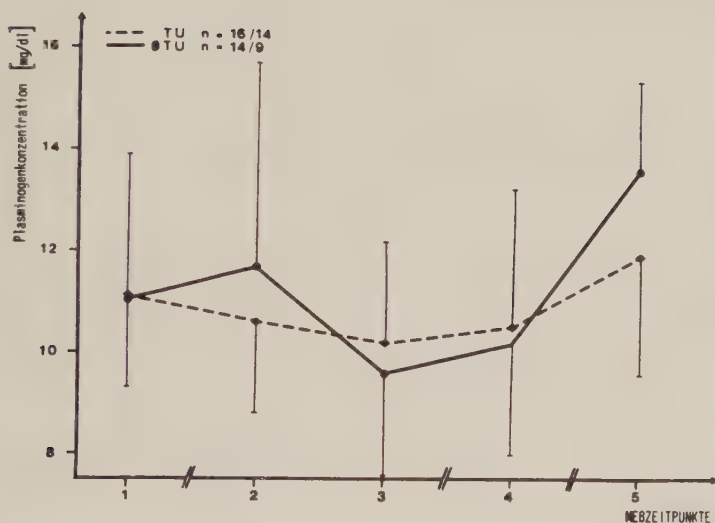


Abbildung 14: Im Vergleich zu Abbildung 13 sind hier die korrigierten Werte der immunologisch bestimmten Plasminogenkonzentrationen (Durchschnittswerte) und der Standardabweichungen bei Tumorkranken (TU) und Vergleichskranken (Ø TU) aufgetragen.

4.7 Fibrin (-ogen)-Spaltprodukte (FDP)

Die FDP-Werte zeigten bereits präoperativ erhebliche Unterschiede zwischen beiden Patientenkollektiven (siehe Abbildung 15).

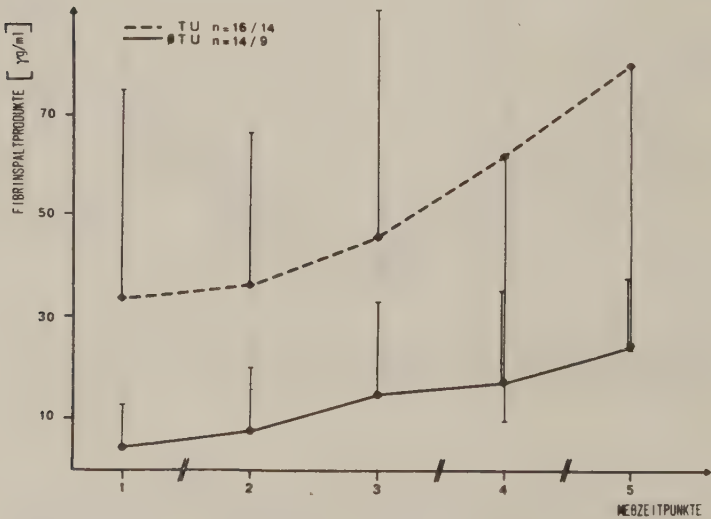


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen der Fibrin (-ogen)-Spaltprodukte im Serum (Durchschnittswerte) und deren Standardabweichungen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten (Ø TU).

Die Kontrollpatienten lagen mit $4 \pm 8,5 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 4) im Normbereich, während die Tumorpatienten mit einem Mittelwert von $34 \pm 41 \mu\text{g/ml}$ bereits pathologisch erhöhte Werte aufwiesen.

Intraoperativ kam es in beiden Gruppen zu einem mäßigen Anstieg der Fibrin (-ogen)-Spaltprodukte. Postoperativ stiegen die FDP-Konzentrationen im Vergleichskollektiv geringfügig weiter an bis auf $24 \pm 13 \mu\text{g/ml}$.

Bei den Tumorpatienten war der FDP-Anstieg postoperativ besonders stark ausgeprägt. Diese Patienten erreichten nach acht Tagen einen Maximalwert von $80 \pm 56 \mu\text{g/ml}$. Die großen Schwankungen der FDP-Werte innerhalb der Gruppen, die durch die großen Standardabweichungen zum Ausdruck kommen, sind zumindest zum Teil auf die nur semiquantitativ mögliche Auswertung des Staphylokokken-Clumping-Testes zurückzuführen.

Während der initiale Anstieg bis zum Meßzeitpunkt 3 bei beiden Kollektiven nicht signifikant war, erfolgte zum Meßzeitpunkt 5 sowohl im Kontrollkollektiv ($p < 0,05$), als auch im Tumorkollektiv ($p < 0,01$) ein signifikanter Anstieg. Beide Verlaufskurven zeigten einen signifikanten Niveauunterschied mit $p < 0,002$.

4.8 Δ -Fibrinogen und seine Korrelation mit den FDP

Die auf dem Vorhandensein von Fibrinogenspaltprodukten beruhende Differenz zwischen immunologisch bestimmtem Fibrinogen und gerinnbarem Fibrinogen (= Δ -Fibrinogen) ist in Abbildung 16 wiedergegeben.

Ein Vergleich mit Abbildung 15 läßt erkennen, daß sich die Δ -Fibrinogenwerte analog zu den FDP verhalten und wie diese über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg ansteigen. Ein signifikanter Anstieg gegenüber den Ausgangswerten ist auch hier erst zum Meßzeitpunkt 5 erreicht, ein signifikanter Unterschied besteht zwischen Tumor- und Vergleichspatienten mit $p < 0,05$ (siehe Tabelle 4).

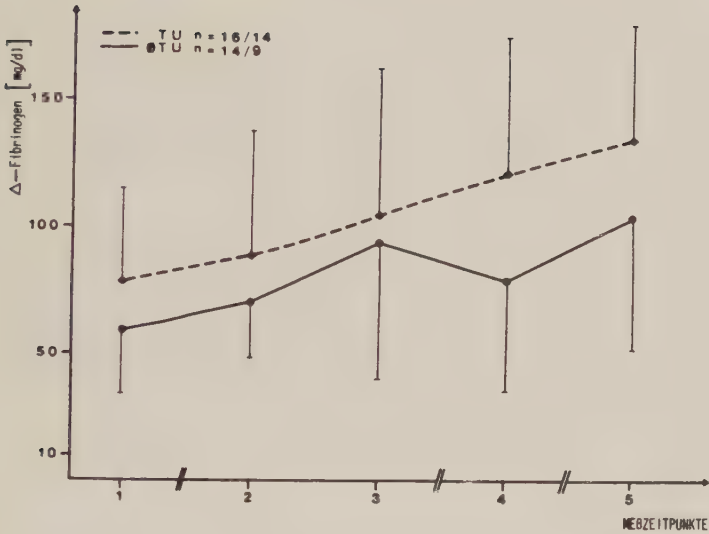


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Δ -Fibrinogenwerte (= Differenzen zwischen immunologisch und funktionell bestimmtem Fibrinogen) und deren Standardabweichungen bei Tumorpatienten (TU) und Vergleichspatienten ($\emptyset$ TU).

KAPITEL 5

DISKUSSION

Täglich werden von Tumorgewebe bis zu $1,5 \times 10^5$ Tumorzellen in die Zirkulation abgegeben (64). Bei einem Adenocarcinom der Mamma wurden sogar $5,3 \times 10^8$ Tumorzellen pro Tag beobachtet (16).

Da sich die Zahl der ausgeschwemmten Tumorzellen bei der operativen Entfernung von Tumorgewebe um ein Vielfaches erhöht (16), erscheint die Gefahr einer Mikrometastasierung unter der Operation besonders hoch. Dennoch entwickeln sich nur wenige dieser Tumorzellen zu Metastasen. Es müssen also bestimmte Konstellationen vorhanden sein, welche die Entstehung von Mikrometastasen begünstigen.

Wie in der Einleitung bereits dargelegt wurde, ist die Bildung eines Fibringerinnsels um die am Endothel anhaftende Tumorzelle eine wesentliche Voraussetzung dafür, daß diese in das perivaskuläre Bindegewebe penetrieren und sich dort zu einer Metastase entwickeln kann (111). Es wurde deshalb untersucht, ob es intraoperativ insbesondere bei Tumorpatienten zu einer Störung des hämostaseologischen Gleichgewichtes kommt.

Neben den routinemäßig gemessenen Gerinnungswerten Quick und PTT bestimmten wir weitere Parameter des koagulatorischen und fibrinolytischen Systems sowohl bei einem Tumor- wie bei einem Vergleichskollektiv vor, während und nach der Operation.

Da mit verschiedenen Methoden der Fibrinogenbestimmung unterschiedliche Anteile an Fibrinogenspaltprodukten miterfaßt werden, wurden mehrere Verfahren parallel durchgeführt und miteinander verglichen. In diesem Rahmen wurde eine Modifikation der Hitzefällung nach Schulz getestet und anhand von zwei etablierten Verfahren (Bestimmung des gerinnbaren Proteins in Anlehnung an Blombäck und immunologische Fibrinogenbestimmung durch radiale Immundiffusion) standardisiert.

Die Ergebnisse dieser modifizierten Hitzefällung zeigten eine enge Korrelation mit den Werten der beiden anderen Verfahren ($R = 0,94$), so daß diese Methode unter Berücksichtigung der ermittelten Umrechnungsfaktoren durchaus zur routinemäßigen Bestimmung geeignet ist.

Anhand der Routineparameter Quick und PTT ließen sich bei unseren Patienten keine Hämostasestörungen nachweisen, obgleich in der Literatur Hinweise vor allem auf pathologisch veränderte PTT-Werte bei Tumorpatienten zu finden sind. So zeigten beispielsweise nach Angaben von Miller und Mitarbeitern etwa 20 % der Tumorpatienten verkürzte PTT-Werte, während bei 8 % der untersuchten Patienten die PTT-Zeit aufgrund eines Mangels an Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren verlängert war (78).

Eine Veränderung der Quick-Werte konnte nur in einem geringeren Prozentsatz nachgewiesen werden. Diese sogenannten Screening-Tests sind jedoch relativ unsensibel. Sie können zum Beispiel eine subklinisch verlaufene DIC im Einzelfall nicht ausschließen (53).

Mit allen drei Methoden der Fibrinogenbestimmung konnten bei den Tumorpatienten präoperativ deutlich höhere Fibrinogenspiegel nachgewiesen werden als bei den Kontrollpatienten. Diese hohen Fibrinogenwerte stehen mit den in der Literatur für Tumorpatienten angegebenen Werten im Einklang (53, 78).

Sie werden auf einen beschleunigten Fibrinogenverbrauch bei subklinisch ablaufenden intravaskulären Gerinnungsvorgängen mit kompensatorischer Überproduktion zurückgeführt (15,78). Hierfür spricht auch die bei diesen Patienten verkürzte Fibrinogenhalbwertszeit (18,67,110).

Als Ursache ist eine erhöhte Thrombinaktivierung zu diskutieren, welche unter anderem auf die bekannte, von Tumorzellen induzierte Freisetzung von Gerinnungsaktivatoren zurückgeführt werden kann (12,85,86,96).

So sind nach Gordon und Lewis maligne Zellen aufgrund spezifischer enzymatischer Eigenschaften in der Lage, durch direkte - Faktor VII unabhängige - Aktivierung von Faktor X Gerinnung auszulösen (36,37). Außerdem enthalten Tumorzellen einen Gewebefaktor, der thromboplastinähnlicher Natur ist, und der den Faktor X Faktor VII-abhängig aktiviert (38,96,101).

Auch unter Berücksichtigung der Plasmaverdünnung, die durch die intra- und postoperativ erfolgte Flüssigkeitssubstitution bedingt ist, fand sich während der Operation bei allen Patienten ein Abfall der Fibrinogenkonzentrationen. Dabei kam es bei beiden Patientenkollektiven zu einer weitgehenden Angleichung der Fibrinogenwerte.

Das belegt, ausgehend von den wesentlich höheren Fibrinogenausgangskonzentrationen der Tumorpatienten, daß bei diesen im Vergleich zu den Kontrollpatienten etwa die vierfache Menge an Fibrinogen umgesetzt wurde (siehe Tabelle 2).

Postoperativ zeigten sowohl die Tumorpatienten als auch die Vergleichspatienten einen raschen Wiederanstieg des Fibrinogens im Sinne einer "Akute Phase-Reaktion" mit einer kompensatorischen Überproduktion über die Ausgangswerte hinaus.

Dieser erhöhte Fibrinogenverbrauch der Tumorpatienten wurde beobachtet, obwohl bei beiden Kollektiven eine Low-Dose-Heparinisierung durchgeführt wurde. Es lag daher nahe, die Konzentration von Antithrombin III, dem Kofaktor von Heparin, zu untersuchen.

Tatsächlich lagen die funktionell bestimmten AT III-Aktivitäten bei den Tumorpatienten bereits vor der Operation unter dem Normbereich. Ähnliche Befunde werden auch von anderen Autoren berichtet und als einer der Gründe für das erhöhte Thromboserisiko dieser Patientengruppe angeführt. Bereits ein relativer AT III-Mangel kann einen Zustand der Hyperkoagulabilität begünstigen (58).

Die Ursache der AT III-Erniedrigung im Tumorkollektiv ist unklar. Eine Verminderung der Lebersyntheseleistung kann bei unseren Patienten aufgrund der klinischen Untersuchungen (es lagen bei keinem der Patienten Lebermetastasen vor) sowie der nachgewiesenen guten Lebersyntheseleistung für Fibrinogen und andere

Proteine in der postoperativen Phase weitgehend ausgeschlossen werden.

Zur Klärung der Frage, ob ein quantitativer AT III-Mangel oder lediglich ein Aktivitätsverlust an AT III den oben beschriebenen Befunden der Tumorpatienten zugrunde liegt, untersuchten wir zusätzlich die AT III-Konzentration mit Hilfe eines immunologischen Verfahrens. Erstaunlicherweise lagen die immunologisch bestimmten AT III-Werte der Tumorpatienten erheblich über den Werten der funktionellen Methode und fielen auch im weiteren Verlauf nicht in pathologische Bereiche ab.

Obwohl in der Literatur eine gute Übereinstimmung zwischen funktionellen und immunologischen Testverfahren angegeben wird (95), wurde für Tumorpatienten und Patienten mit DIC - also für Patienten, bei denen eine erhöhte Thrombinaktivierung vorliegt - eine wesentlich schlechtere Korrelation festgestellt.

Miyashita und Mitarbeiter ermittelten beispielsweise bei Tumor- und DIC-Patienten Korrelationskoeffizienten (R) von nur 0,68 bzw. 0,65 im Vergleich zu Gesunden mit $R = 0,94$ (79).

Als Grund für diese Abweichungen läßt sich die Anwesenheit eines AT III-Inhibitors bei Tumorpatienten diskutieren. Ein solcher wurde aber bisher nicht nachgewiesen. Andererseits konnte gezeigt werden, daß Thrombin in der Lage ist, insbesondere bei Anwesenheit von Heparin an seinem Inhibitor AT III eine proteolytische Abspaltung eines kleinen Peptidanteiles zu bewirken.

Daraus resultiert ein immunologisch zwar nicht unterscheidbares, aber funktionell inaktives AT III-Molekül (72,73,74). Somit könnte die Differenz zwischen den mit beiden Methoden bestimmten AT III-Werten auch Ausdruck der beschriebenen hohen Thrombinaktivität der Tumorpatienten sein.

Wichtig erscheint jedenfalls, daß diese Unterschiede bei bestimmten Patientengruppen - wie z.B. Tumorpatienten - berücksichtigt werden und daß zur Beurteilung der tatsächlichen Thrombin-Inhibitoraktivität nur funktionelle Tests zur Anwendung kommen.

Die bereits präoperativ verminderte AT III-Aktivität der Tumorpatienten fiel im Verlauf der Operation auf durchschnittlich 45 % ab, was wir unter anderem auf eine Erschöpfung der AT-III-Reserven durch Freisetzung grösserer Mengen an Gewebsthrombokinase zurückführen. Ähnliche Befunde mit postoperativ signifikanter AT III-Depression bei Malignompatienten konnte auch von Kußmann und Mitarbeitern nachgewiesen werden (58).

Es ist bekannt, daß die für eine effektive Antikoagulation erforderliche Heparindosis abhängig ist von der Höhe des AT III-Spiegels (5). Eine Korrelation zwischen präoperativ erniedrigten AT III-Aktivitäten und dem Auftreten tiefer Beinvenenthrombosen konnte nachgewiesen werden (101).

Gleichfalls zeigten Patienten, die nach Hüftgelenkoperationen tiefe Venenthrombosen entwickelt hatten, präoperativ signifikant erniedrigte AT III-Spiegel (82).

Es erscheint daher fraglich, ob die üblicherweise durchgeführte Low-Dose-Heparinisierung mit 3 x 5000 IE Heparin / Tag während der Operationsbelastung insbesondere bei Tumorpatienten ausreichend ist.

Eine signifikante Verminderung des Thrombose- bzw. des Embolierisikos, wie es beispielsweise in der 1975 in Großbritannien durchgeführten multizentrischen Studie nachgewiesen wurde (51), kann deshalb aufgrund unserer Ergebnisse auf Tumorpatienten nicht unbedingt übertragen werden. Die Effektivität der herkömmlichen Behandlung von Tumorpatienten unter der Operation mit niedrigen Heparindosen wurde auch von anderer Seite angezweifelt (43,81).

Die hohe Thrombinaktivität bei Tumorpatienten wird auch durch die hohen FPA-Werte dieser Patientengruppe belegt. In Übereinstimmung mit den für Malignompatienten bekannt hohen FPA-Plasmaspiegeln (80,87,88) waren bereits die präoperativen Werte der Tumorpatienten auf mehr als das Doppelte erhöht.

Peuscher und Mitarbeiter ermittelten beispielsweise bei 95 % der von ihnen untersuchten Tumorpatienten mit aktiver Metastasierung erhöhte FPA-Spiegel, während Patienten in Remission oder ohne Metastasen zu 80 bis 90 % normale Werte aufwiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten sie zur Diskussion, FPA als Marker für die Aktivität und das Ausmaß des malignen Prozesses zu benutzen (10,88).

Neben der Entstehung von FPA durch intravaskuläre Gerinnungsvorgänge wird auch eine Abspaltung im extra-

vaskulären Raum diskutiert (80, 114). Diese spielt aber wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

Bemerkenswert war im postoperativen Verlauf der Wiederanstieg der FPA-Spiegel bei drei Patienten im Tumorkollektiv zwischen dem ersten und achten Tag nach der Operation. Diese FPA-Anstiege sind vermutlich Ausdruck des bei Tumorpatienten bekannten erhöhten Thromboserisikos und weisen auf eine in unserem Fall noch subklinisch verlaufene DIC hin. Ähnliche Veränderungen konnten im Kontrollkollektiv nicht beobachtet werden.

Bei der Analyse dieser drei Einzelfälle zeigte sich, daß bei zwei der Patienten ein histologisch gesichertes Adenocarcinom vorlag (Adeno-Ca des Rectums und muzinöses Adeno-Ca der Mamma). Dieser Tumortyp ist besonders prädestiniert, Koagulationsstörungen hervorzubringen, wofür man die von ihm produzierten Muzine verantwortlich macht (89).

Beim dritten Patienten spielte eventuell das frühzeitige Absetzen von Heparin mit einem gewissen Rebound-Effekt eine Rolle (108). Da es unter Heparin-gabe zu einer Abnahme der AT III-Konzentration im Plasma kommt (71), besteht nach Absetzung der Heparinisierung ein potentiell hyperkoagulabler Zustand. Bei noch erniedrigter AT III-Konzentration und bereits fehlender, heparin-induzierter AT III-Aktivitätssteigerung unterliegen solche Patienten daher für zwei bis drei Tage einem erhöhten Thromboserisiko.

Von Interesse war nun, inwieweit das bei den Tumorpatienten in erhöhtem Maße zu Fibrin umgesetzte Fi-

brinogen durch Fibrinolyse wieder abgebaut wurde.

Die von uns gefundenen bereits präoperativ erhöhten FDP-Werte der Tumorpatienten stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (6, 53, 78) und werden als Ausdruck einer erhöhten tumorinduzierten fibrinolytischen Aktivität angesehen. Vermutlich stammen sie auch zum Teil aus Fibrin, welches im Tumorbereich abgelagert war (116).

Die Freisetzung fibrinolytischer Substanzen direkt aus Tumorgewebe wurde mehrfach belegt (4,9,19,32,85). Dan und Reich zeigten, daß durch onkogene Viren transformierte Fibroblasten einen Plasminogenaktivator an das Nährmedium abgeben, der mit Urokinase immunologisch identisch ist (19). Auch nicht mit Urokinase identische Plasminogenaktivatoren wurden beschrieben (9).

Auffallend war, daß bei beiden Patientenkollektiven die Fibrinolyse (gemessen an dem Anstieg der FDP-Werte) gegenüber der Thrombinaktivierung (gemessen an dem Anstieg der FPA-Spiegel) verzögert eingesetzt hatte.

Da die Differenz zwischen immunologischer und funktioneller Fibrinogenbestimmung indirekt den Anteil an FDP zum Ausdruck bringt, spiegeln diese - von uns als Δ -Fibrinogen bezeichneten - Werte in etwa ebenfalls die Höhe fibrinolytischer Aktivitäten wider. So zeigte sich auch ein weitgehend paralleler Verlauf der FDP- und Δ -Fibrinogenwerte.

Eine Ursache für die verspätet einsetzende Fibrinolyse kann in dem intraoperativen Plasminogenabfall ge-

sehen werden, der aufgrund unserer Untersuchungen weitgehend auf Hämodilution zurückzuführen ist. Diese beobachtete Imbalance zwischen Fibrinbildung und Fibrinolyse läßt auf eine vermehrte intraoperative Fibrinablagerung in der Mikrozirkulation schließen.

Unter Berücksichtigung der Bedeutung des Fibrins bei der Entstehung von Mikrometastasen erscheint es deshalb möglich, daß die beobachteten intraoperativen Hämostaseveränderungen eine Metastasierung begünstigen.

Die von mehreren Autoren geforderte präoperative Bestimmung der AT III-Aktivität bei Patienten mit hohem Thromboserisiko (13,58,82,101), ist unseren Ergebnissen zufolge insbesondere bei Tumorkranken sinnvoll. So kann eine Vorhersage über die Wirksamkeit einer prophylaktischen Low-Dose-Heparinisierung gemacht werden.

Da, um den gleichen antithrombotischen Effekt zu erzielen, einerseits die Heparindosis erhöht werden kann (20,28), andererseits die Möglichkeit besteht, AT III in Form von fresh frozen plasma oder AT III-Konzentrat zu substituieren (107), wäre bei entsprechend niedrigen AT III-Werten dann eine dieser beiden Vorgehensweisen indiziert.

KAPITEL 6

ZUSAMMENFASSUNG

Hämostaseveränderungen im Sinne von Hyperkoagulopathien mit Fibrinablagerungen in der Mikrozirkulation spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Metastasen. Die Gefahr einer Mikrometastasierung erscheint aufgrund der hohen Zahl an ausgeschwemmten Tumorzellen unter der Operation besonders hoch.

Daher untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit das Verhalten spezifischer Parameter des koagulatorischen und fibrinolytischen Systems sowohl bei einem Tumor- wie bei einem Vergleichskollektiv vor, während und nach der Operation.

Die Ergebnisse der bestimmten Hämostaseparameter können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Fibrinogen:

In Übereinstimmung mit den in der Literatur für Tumorpatienten angegebenen Werten lagen sowohl die funktionell als auch die immunologisch bestimmten Fibrinogenkonzentrationen der Tumorpatienten präoperativ deutlich über den Konzentrationen der Kontrollpatienten.

Aufgrund der miterfaßten Spaltprodukte ließen sich mit der immunologischen Methode höhere Werte nachweisen als durch Thrombinfällung. Die hohen Fibrinogenwerte der Tumorpatienten sind Ausdruck eines beschleunigten Fibrinogenumsatzes mit kompensatorischer Überpro-

duktion. Intraoperativ wurde bei den Tumorpatienten im Vergleich zu den Kontrollpatienten etwa die vierfache Menge an Fibrinogen umgesetzt, obgleich in beiden Patientenkollektiven eine Low-Dose-Heparinisierung durchgeführt wurde. Der rasche postoperative Wiederanstieg der Fibrinogenwerte in beiden Patientenkollektiven belegt neben anderen Faktoren die gute Lebersyntheseleistung aller Patienten.

AT III:

Auffallend war der bei den Tumorpatienten nachweisbare Unterschied zwischen funktionell und immunologisch bestimmtem AT III, der möglicherweise auf einen bei diesen Patienten vorliegenden AT III-Inhibitor zurückzuführen ist. Dieser Befund mit bereits präoperativ pathologisch erniedrigten AT III-Werten kann als eine der Ursachen für das erhöhte Thromboserisiko der Tumorpatienten gewertet werden.

In beiden Patientenkollektiven kam es intraoperativ durch Freisetzung von Gewebsthrombokinase zu einem Verbrauch der AT III-Reserven, der mit der Operationsdauer korrelierte. Dabei erreichten die Tumorpatienten Werte von durchschnittlich 45 % der Norm. Somit muß die Wirksamkeit der üblicherweise durchgeführten Low-Dose-Heparinisierung während der Operationsbelastung insbesondere bei Tumorpatienten in Frage gestellt werden.

FPA:

Die hohen FPA-Werte der Tumorpatienten stimmen mit den Angaben der Literatur überein und belegen die hohe Thrombinaktivität dieser Patientengruppe. Auch der intraoperative FPA-Anstieg ist als Ausdruck einer erhöhten Thrombinwirkung bei verminderter inhibitorischer AT III-Aktivität zu verstehen.

Bemerkenswert war im postoperativen Verlauf der Wiederanstieg der FPA-Spiegel bei drei Patienten des Tumorkollektives auf durchschnittlich 117 ng/ml. Dies deutet auf eine subklinisch verlaufene Gerinnungsstörung dieser Patienten hin und stimmt mit der statistisch gesicherten Beobachtung überein, daß Tumorpatienten in einem signifikant höheren Prozentsatz Thrombosen entwickeln als Patienten mit nicht malignen Erkrankungen.

Plasminogen:

Ähnlich wie beim AT III war auch hier bei den Tumorpatienten eine Differenz zwischen immunologisch und funktionell bestimmten Werten festzustellen; diese war jedoch weniger ausgeprägt und beschränkte sich auf die Ausgangswerte.

Das fibrinolytische Potential unterlag während der Operation einer zunehmenden verdünnungsbedingten Erniedrigung, so daß die Fibrinolyse erst postoperativ mit der Erholung der Plasminogenreserven einsetzen konnte.

FDP:

Die präoperativ hohen FDP-Serumspiegel der Tumorpazienten werden als Zeichen der fibrinolytischen Aktivität der Tumorzellen angesehen und stammen zum Teil aus Fibrin, das den Tumor umgibt. Entsprechend der verzögert einsetzenden Fibrinolyse (siehe oben) war bei beiden Kollektiven erst am achten postoperativen Tag ein signifikanter FDP-Anstieg zu verzeichnen.

Bei diesen postoperativ anfallenden FDP handelte es sich vermutlich auch um abgebautes Fibrinmaterial, welches intraoperativ aufgrund der bestehenden Imbalance zwischen Fibrinbildung und Fibrinolyse im Kapillarbereich abgelagert wurde. Entsprechend dem beträchtlich größeren intraoperativen Fibrinogenumsatz lagen die FDP-Werte der Tumorpazienten signifikant höher als bei den Vergleichspazienten.

Der Anstieg der FDP-Konzentrationen korrelierte mit der Zunahme der Differenzwerte zwischen funktionell und immunologisch bestimmtem Fibrinogen (Δ -Fibrinogen) (siehe oben).

Fibrinogenbestimmung:

Im Rahmen des experimentellen Teils wurde eine neue Methode zur Fibrinogenbestimmung getestet. Diese kann für die klinische Routine empfohlen werden.

Die Bedeutung der nachgewiesenen Hämostaseveränderungen für die Entstehung von Metastasen wurde disku-

tiert. Insgesamt muß festgehalten werden, daß eine alleinige perioperative Low-Dose-Heparinisierung bei Tumorpatienten aufgrund der erniedrigten AT III-Aktivitäten unzureichend ist. So sollte bei diesen Patienten vor Heparin-gabe die funktionelle AT III-Bestimmung und gegebenenfalls die präoperative AT III-Substitution vorgenommen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABILDGAARD, U.; GRAVEM, K.; GODAL, H.C.:
Assay of progressive antithrombin in plasma.
Thromb. Diath Haemorrh. 24, 224-229 (1970).
2. ALEXANDER, J.W.; ALTEMEIER, W.A.:
Susceptibility of injured tissues to haematogenous
metastasis - an experimental study.
Ann. Surg. 159, 933-943 (1964).
3. ALKJAERSIG, N.; FLETCHER, A.P.; SHERRY, S.:
The activation of human plasminogen.
J. Biol. Chem. 233, 86-90 (1958).
4. ASTEDT, B.; HOLMBERG, L.:
Immunological identity of urokinase and ovarian
carcinoma plasminogen activator released in
tissue culture.
Nature, 261, 595-597 (1976).
5. BARROWCLIFFE, T.W.; JOHNSON, E.A.; THOMAS, D.:
Antithrombin III and Heparin.
Br. Med. Bull., 34, 143-150 (1978).
6. BICK, R.L.:
Alterations of hemostasis associated with malignancy: Etiology, pathophysiology, diagnosis and management.
Semin. Thromb. Hemost. 5, 1-26 (1978).
7. BIGGS, R.; DENSON, K.W.E.; AKMAN, N.; BORRETT, R.F.:
Antithrombin III, antifactor Xa and heparin.
Br. J. Haematol. 19, 283 (1970).

8. BILEZIKIAN, S.B. et al.:
Radioimmunoassay of human fibrinopeptide B and kinetics of fibrinopeptide cleavage by different Enzymes.
J. of Clin. Invest., 56, 438 (1975).
9. BINDER, B.; SPRAGY, J.; AUSTEN, K.:
Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates.
J. Biol. Chem., 254, 1998-2003 (1979).
10. BLOMBÄCK, B.; BLOMBACK, M.:
Purification of human and bovine fibrinogen.
Arkiv for Kemi 10, 419-443 (1956).
11. BLOMBÄCK, B.; YAMASHINO, J.:
On the N-terminal amino acids in fibrinogen and fibrin.
Arkiv Kemi 12, 299 (1958).
12. BOGGUST, W.A.; O'BRIAN, D.J.; O'MEARA, R.A.Q.; THORNES, R.D.:
The coagulative factors of normal human and human cancer tissue.
Ir. J. Med. Sci., 477, 133-144 (1978).
13. BOKAREW, I.M.; BUTAROW, W.N.; GORDEJEW, P.S.; KUSNEZOW, W.A.:
Die Anwendung von synthetischen chromogenen Substraten zur Kontrolle der antithrombotischen Therapie mit kleinen Heparin-Dosen.
Folia Haematol. (Leipzig), 109 (1) (1982).

14. BROWN, J.M.:
A Study of the Mechanism by Which Antikoagulation with Warfarin Inhibits Blood - borne Metastases.
Cancer Res. 33, 1217-1224 (1973).
15. BRUGAROLAS, A.; ELIAS, E.G.:
Incidence of Hyperfibrinogenemia in 1961 Patients with cancer.
J. Surg. Oncol. 5, 359-364 (1973).
16. BUTLER, T.P.; GULLINO, P.M.:
Quantitation of Cell Shedding into Efferent Blood of Mammary Adenocarcinoma.
Cancer Res. 35, 512-516 (1975).
17. CAPRINI, J.A.; SENER, S.F.:
Altered coagulability in Cancer Patients.
Cancer 32 (3), 162-172 (1982).
18. CASARA, D.; CARTEI, G.; COSTA, S.:
Radioiodinated Fibrinogen Distribution in Cancer Patients.
Eur. J. Nucl. Med. 5, 27-29 (1980).
19. DAN, K.; REICH, E.:
Serine Enzymes released by cultured Neoplastic Cells.
J. Exp. Med. 147 (3), 745-757 (1978).
20. DENSON, K.W.E.; BONNAR, J.:
The measurement of Heparin - a method based on the potentiation of anti-factor Xa.
Thromb. Diath. Haemorrh. 30, 471 (1973).

21. DOMBROSE, F.A.; SEEGER, W.H.; SEDENSKY, J.A.:
Antithrombin Inhibition of thrombin and anteprothrombin (F-Xa) as a mutual depletion system.
Thromb. Diath. Haemorrh. 21, 103 (1971).
22. DOOLITTLE, R.F.:
Fibrinogen: Hauptakteur bei der Blutgerinnung.
Spektrum der Wissenschaft 2, 58-69 (1982).
23. DVORAK, H.F.; DICKERSIN, G.R.; DVORAK, A.M. et al.:
Human breast carcinoma: Fibrin deposits and distribution, Microvasculature and infarction.
Cancer Inst. 67, 2, 335-345 (1981).
24. EDLIS, H.E.; GOUDSMIT; BRINDLEY, C.; NIEMETZ, J.:
Trial of Heparin and Cyclophosphamide (NSC-26271) in the treatment of Lung Cancer.
Cancer Treat. Rep. 60, 575-578 (1976).
25. EDWARDS, E.A.:
Migrating thrombophlebitis associated with carcinoma.
New Eng. J. Med. 240, 1030-1035 (1949).
26. ELIAS, E.G.; BRUGAROLAS, A.:
The role of heparin in the chemotherapy of solid tumors. Preliminary clinical trial in carcinoma of the lung.
Cancer chemotherapy Reports, 56, 783 - 785 (1972).
27. ELIAS, E.G.; SHUKLA, S.K.; MINK, L.B.:
Heparin and chemotherapy in the management of inoperable lung carcinoma.
Cancer 36, 129-136 (1975).

28. ESTES, J.W.:
Applications of the kinetics of Heparin to the
formulation of dosage Schedules.
in: Bradshaw, R.A., Wessler, S. (eds.): Heparin:
Structure, function and clinical Implications,
N. York, Plenum, p. 181 (1975).
29. FAGERHOE, M.K.; ABILDGAARD, U.:
Immunological Studies on human antithrombin III.
Influence of age, sex and use of oral contra-
ceptives on serum concentration.
Scand. J. Haematol. 7, 10-17 (1970).
30. FAREED, J. et al.:
Laboratory Evaluation of Antithrombin III: A
Critical Overview of Currently Available Methods
for Antithrombin III Measurements.
Seminars in Thrombosis and Hemostasis, Vol. 8,
No. 4, 288-301 (1982).
31. FIDLER, I.J.:
The relationship of Embolic Homogeneity, Number,
Size and Viability to the Incidence of Experi-
mental Metastasis.
European J. Cancer 9, 223 (1973).
32. FISCHER, A.:
Beitrag zur Biologie der Gewebezellen. Eine ver-
gleichende biologische Studie der normalen und
malignen Gewebezellen in vitro.
Arch. Entwicklungsmech. Organ., 104, 210-218
(1925).

33. GASTPAR, H.:
Inhibition of Cancer Cell stickiness by anti-coagulants, fibrinolytic drugs and pyrimido-pyrimidine-derivats.
Hematologic Review 3, 1 (1972).
34. GITEL, S.N.:
Evidence for a catalytic role of heparin in anti-coagulation reactions.
in: Bradshaw, R.A.; Wessler, S. (eds.): Heparin: Structure, Function and Clinical Implications.
N. York, Plenum, p. 243 (1975).
35. GOLLWITZER, R.; BODE, W.; SCHRAMM, H.J.;
TYPHE, D.; GUCKENBERGER, R.:
Paracrystalline structure of native human fibrinogen.
in: Peeters, H. (Ed.): Protides of biological fluids. 28, 307 (1980).
36. GORDON, S.G.; FRANKS, J.J.; LEWIS, B.:
Cancer procoagulant A: A factor X activating procoagulant from malignant tissue.
Thromb. Res. 6, 127-137 (1945).
37. GORDON, S.G.; FRANKS, J.J.; LEWIS, B.J.:
Comparison of procoagulant activities in extracts of normal and malignant human tissue.
J. Natl. Cancer Inst. 62, 773-776 (1979)
38. GRALNICK, H.R.:
Cancer Cell procoagulant activity.
Thromb. Haemost. 42, 352 (1979).

39. HAFTER, R.; GRAEFF, H.:
Estimation of soluble fibrin monomer complexes
by agarose gel filtration.
in: Progress in Chemical Fibrinolysis and
Thrombolysis, Vol. 2 Raven Press, New York (1976).
40. HALL, C.E.; SLAYTER, H.S.:
The fibrinogen molecule: Its size, shape and mode
of polymerisation.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 11 (1959).
41. HAMPERL, H.:
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der patho-
logischen Anatomie. S. 177, Springer, Berlin
(1968).
42. HAWINGER, J. et al.:
Measurement of fibrinogen and fibrinogen degra-
ding products.
43. HEINRICH, F.:
Prophylaxe venöser Thrombosen in Klinik und Pra-
xis.
Therapiewoche 32, 594-604 (1982).
44. HENSCHEN, A.:
Number and reactivity of disulfide bonds in fi-
brinogen and fibrin.
Arkiv Kemi 22, 355 (1964).
45. HENSCHEN, A.; LOTTSPREICH, F.; HESSEL, B.:
Amino Acid sequence of human fibrin. Preliminary
note on the completion of the intermediate part

- of the α -chain sequence.
in: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1951
(1976).
46. HENSCHEN, A.:
Fibrinogen-Blutgerinnungsfaktor I: Biochemische
Aspekte.
Hämostasiologie, 1, 1-23 (1981).
47. HILGARD, P.; SCHULTE, H.; WETZIG, G. et al.:
Oral anticoagulation in the treatment of a spon-
taneous metastasing murine tumour (3LL).
Brit. Journ. of Cancer 35, 78-85 (1977).
48. HILLER, E.; RIESS, H.; HAFTER, R.; GRAEFF, H.:
Evaluation of Hypercoagulability After Remission
Induction Chemotherapy of Acute Leukemia.
Blut 41, 359-366 (1980).
49. HOOVER, H.C.Jr.; JONES, P.; KETCHAM, A.S.:
The optimal level of anticoagulation for decreas-
ing experimental metastasis.
Surgery 79, 625-630 (1976).
50. HOOVER, H.C. Jr.; KETCHAM, A.S.:
Decreasing Experimental Metastasis Formation
With Anticoagulation and Chemotherapy.
Surg. Forum 26, 173-174 (1975).
51. KAKKAR, V.V.; CORRIGAN, T.P.; FOSSARD, D.P.:
Prevention of fatal postoperative pulmonary embolism
by low dosis of heparin. An International Multi-
centre Trial.
Lancet II, 45-51 (1975).

52. KAWAGUCHI, T.; NAKAMURA, K.:
Relationship between transcerebral Passage of
Tumor Cells and Brain Metastasis.
Gann 68, 65-71 (1977).
53. KIES, M.S.; POSCH, J.J.Jr.; GIOLMA, I.P.;
RUBIN, R.N.:
Hemostatic function in cancer patients.
Cancer 46 (4), 831-837 (1980).
54. KINJO, M.:
Lodgement and Extravasation of Tumour Cells in
Blood - Borne Metastasis. An Electron Microscope
Study.
Br. J. Cancer 38, 293 (1978).
55. KIRSCH, W.M.; SCHULZ, D.; VAN BUSKIRK, J.I.;
YOUNG, E.E.:
Effects of sodium warfarin and other carcino-
static agents on malignant cells: A study of
drug synergy.
J. Med. 5, 69-82 (1974).
56. KOCKUM, C. et al.:
Rapid Radioimmunoassay of Human Fibrinopeptide
A - Removal of Cross - Reacting Fibrinogen with
Bentonite.
Thromb. Res. 19, 589-598 (1980).
57. KOCKUM, C.:
Radioimmunoassay of Fibrinopeptide A - Immuno-
reactivity of Fibrinogen and Fibrinogen Frag-
ments.
Thromb. Res. 19, 639-646 (1980).

58. KUSSMAN, J.; HIRCHE, H.; SENGUPTA, R.:
Perioperative Plasma - Antithrombinaktivität unter "Low-dose"-Heparin-Prophylaxe.
Dtsch.med.Wschr. 108, 449-452 (1983).
59. LAKI, K.; GLADNER, J.A.; FOLK, J.E.:
Some aspects of the fibrinogen-fibrin transition.
Nature 187, 758 (1960).
60. LANE, D.A.; PRESTON, F.E.; VAN ROSS, M.E.;
KAKKAR, V.V.:
Characterization of serum fibrinogen and fibrin fragments produced during disseminated intravascular coagulation.
Br. J. Haematol. 40, 609 (1978).
61. LATALLO, Z.S. et al.:
Assessment of Plasma Fibrinolytic System with use of Chromogenic Substrate.
Haemostasis 7, 150-154 (1978).
62. LEHMACHER, W.; LIENERT, G.A.:
Nichtparametrischer Vergleich von Testprofilen und Verlaufskurven vor und nach einer Behandlung.
Psychol. Beiträge 22, 147-153 (1980).
63. LIEBERMANN, J.S.; BORRERO, J.; URDANETTA, E.;
WRIGHT, I.S.:
Thrombophlebitis and Cancer.
J.A.M.A. 177, 542 (1961).
64. LIOTTA, L.A.; KLEINERMAN, J.; SAIDEL, G.M.:
Quantitative Relationship of Intravascular Tumor

Cells, Tumor Vessels and Pulmonary Metastasis following Tumor Implantation.

Cancer Res. 34, 997-1004 (1974).

65. LIOTTA, L.A.; KLEINERMAN, J.; SAIDEL, G.M.:
The Significance of Hematogenous Tumor Cell Clumps in the Metastatic Process.
Cancer Res. 36, 889-894 (1976).
66. LOTTSPEICH, F.; HENSCHEN, A.:
Amino acid sequence of human fibrin. Preliminary note on the completion of the γ -chain sequence.
in: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 935 (1977).
67. LYMAN, G.H.; BOTTIGOLE, R.E.; ROBSON, E. et al.:
Fibrinogen kinetics in patients with neoplastic disease.
Cancer 41, 1113-1122 (1978).
68. MACHOWICH, R.; BLASKO, G.; ARANYI, P.:
The Interaction of Thrombin and Heparin. Heat inactivation kinetics.
Thromb. Res. 7, 253 (1975).
69. MAHN, I.; MÜLLER-BERGHHAUS, G.:
Turnover studies of des-A fibrin and fibrinogen in healthy human beings.
Thrombos. Haemostas. 38, 220 (1977).
70. MANCINI, G.; CARBONARA, A.G.; HEREMANS, J.:
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2, 235 (1965).

71. MARCINIAK, E.; GOCKERMAN, J.P.:
Heparin-induced decrease in circulating anti-thrombin III.
Lancet 2, 581 (1977).
72. MARCINIAK, E.:
Thrombin - induced Proteolysis of Human Anti-thrombin III: an Outstanding Contribution of Heparin.
Brit. Journ. of Haematology, 48, 325-336 (1981).
73. MARCINIAK, E.:
Differential Role of Fractionated Heparin in Antithrombin III Proteolysis.
Blood 59, 576-581 (1982).
74. MARCINIAK, E.; GORA-MASLAK, G.:
Enhancement By Heparin Of Thrombin - Induced Antithrombin III Proteolysis: Its Relation To The Molecular Weight And Anticoagulant Activity Of Heparin.
Thromb. Res. 28, 411-421 (1982).
75. MARDER, V.J.; BUDZYNSKI, A.Z.; JAMES, H.L.:
High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin. III. Their NH_2 -terminal amino acids and comparison with the ' NH_2 -terminal disulfide knot'.
J. Biol. Chem. 247, 4775 (1972).
76. MATACIC, S.; LOEWY, A.G.:
The identification of isopeptide cross-links in insoluble fibrin.
Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 356 (1968).

77. MILLAR, R.C.; KETCHAM, A.S.:
The effect of heparin and warfarin on primary
an metastatic tumours.
J. Med. 5, 23 (1974).

78. MILLER, S.P.; SANCHEZ-AVALOS, I.; STEFANSKI, T.;
ZUCKERMAN, L.:
Coagulation disorders in Cancer. I. Clinical and
laboratory studies.
Cancer 20, 1452 (1967).

79. MIYASHITA, CH.; DUMITRESCU, E.; WENZEL, E.:
Some Observations on Concentration and Coagulabili-
ty of Fibrinogen in Patients with Cancer, With
and Without Metastasis.
in: Fibrinogen - Recent Biochemical and Medical
Aspects. ed. by Walter de Gruyter, Berlin, New
York (1982).

80. MOMBELLY, G.; ROUX, A.; HAEBERLI, A.; STRAUB, P.W.:
Comparison of ^{125}J -Fibrinogen Kinetics and Fi-
brinopeptide A in Patients With Disseminated
Neoplasias.
Blood Vol. 6012, 381-388 (1982).

81. MOORE, F.D.; OSTEN, R.T.; KARP, D.D. et al.:
Anticoagulants, venous thromboembolism and the
cancer patients.
Arch. Surg. 116, 405-407 (1981).

82. NILSEN, D.W.T.; JEREMIC, N.; WEIGERT, O.K.:
An Attempt at Predicting Postoperative Deep Vein
Thrombosis by Preoperative Coagulation Studies
in Patient undergoing Total Hip Replacement.
Thromb. and Haemostasis 43, 194-197 (1980).

83. NOSSEL, H.L. et al.:
Radioimmunoassay of human fibrinopeptide A.
Proc. nat. Acad. Sci. 68, 2350 (1971).
84. NOSSEL, H.L. et al.:
Measurement of fibrinopeptide A in human blood.
J. clin. Invest. 54, 43 (1974).
85. O'MEARA, R.A.Q.:
Coagulative properties of Cancers.
Ir. J. Med. Sci. 394, 474-479 (1958).
86. O'MEARA, R.A.Q.; THORNES, R.D.:
Some properties of the cancer coagulative factor.
Ir. J. Med. Sci. 423, 106-112 (1961).
87. PECK, S.D. et al.:
Disseminated Intravascular Coagulation in Cancer Patients: Supportive Evidence.
Cancer 31, 1114-1119 (1973).
88. PEUSCHER, F.W.; CLETON, J.J.; ARMSTRONG, L. et al.:
Significance of plasma fibrinopeptide A (FPA)
in patients with malignancy.
J. Lab. Clin. Med. 96, 5 (1980).
89. PINEO, G.F.; BRAIN, M.C.; GALLUS, A.S. et al.:
Tumors mucus production and hypercoagulability.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 230, 262-270 (1974).
90. PISANO, I.J.; FINLAYSON, J.S.; PEYTON, M.P.:
Cross-link in fibrin polymerized by Factor XIII:
 ϵ -(γ -glutamyl) lysine.
Science 160, 892 (1968).

91. POGGI, A.; MUSSONI, L.; KORNBLIHIT, L. et al.:
Warfarin enantiomers, anticoagulation on experimental tumor metastasis.
Lancet I, 136-164 (1978).
92. ROBINSON, K.P.; HOPPE, E.:
The development of blood-borne metastasis:
The effect of local trauma and ischaemia.
Arch. Surg., Chicago 85, 720-724 (1962).
93. ROSENBERG, R.; DAMUS, P.S.:
The purification and mechanism of action of
human antithrombin heparin cofactor.
J. Biol. Chem. 248, 6490 (1973).
94. ROSENBERG, R.:
Chemistry of the hemostatic mechanism and its
relationship to the action of heparin.
Fed. Proc. 36, 10 (1977).
95. RUBIN, R.N.; KIES, M.S.; POSCH, J.J.Jr.:
Measurements of antithrombin III in solid tumor
patients with and without hepatic metastasis.
Thromb. Res. 18 (3-4), 353-360 (1980).
96. SAKURAGAWA, N.; TAKAHASHI, K.; HOSHIYAMA, M. et al.:
The extract from the tissue of gastric cancer
as procoagulant in disseminated intravascular
coagulation syndrome.
Thromb. Res. 10, 457-463 (1977).
97. SCHRAMM, W.; SCHMID, M.; ERHARD, F.W.:
Radioimmunoassay von Fibrinopeptid A: Doppelantikörpermethode.
Fortschr. Med. 95, 1291 (1977).

98. SCHULZ, F.H.:
Eine einfache Bewertungsmethode von Leberparen-
chymschäden (volumetrische Fibrinbestimmung).
Acta hepatologica 3, 306-310 (1955).
99. SLICHTER, S.J.; HARKER, L.A.:
Hemostasis in malignancy.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 230, 252 (1974).
100. SMITH, I.P.; YATES, P.D.:
Thrombotic Syndrome associated with carcinoma.
J. Pathol. Bacteriol. 70, 111 (1955).
101. STAMATAKIS, J.D.; LAWRENCE, D.; KAKKAR, V.V.:
Surgery, venous thrombosis and anti-Xa.
Brit. J. Surg. 64, 709 (1977).
102. SVANBERG, L.:
Thromboplastic activity of human ovarian tumors.
Thromb. Res. 6, 307-313 (1975).
103. THALER, E.; NIESSNER, H.; KLEINBERGER, G.;
GABNER, A.:
Antithrombin III replacement therapy in patients
with congenital and acquired antithrombin III de-
ficiency.
Thromb. Haemost. 42, 327-332 (1979).
104. THORNES, R.D.:
Oral Anticoagulant Therapy of Human Cancer.
J. Med. 5, 83-91 (1974).
105. TROUSSEAU, A.:
Phlegmasia alba dolens.
in: *Clinique medicale de l'Hôtel - Dieu de Paris*,
3, 654 (1965).

106. WARREN, B.A.; GÜLDNER, F.H.:
Ultrastructure of the Adhesion of Hela Cells
to Human Vein Wall.
Angiologica 6, 32-53 (1969).
107. WARREN, B.A.:
Platelet-tumor Cell Interactions: Morphological
Studies. in: Platelets: A Multidisciplinary
Approach. ed. by G. de Gaetonaio, Garattini, G.,
427-446 Raven Press, New York (1978).
108. WESSLER, S.; GITEL, S.N.:
Heparin: New Concepts Relevant to Clinical
Use.
Blood 53,4, 525-544 (1979).
109. WHITE, H.; GRIFFITHS, J.D.:
Circulating Malignant Cells and Fibrinolysis
during Resection of Colorectal Cancer.
Proc. roy. soc. Med. 69 (1976).
110. WILLIAMS, C.K.O.; PINEO, G.F.; GALLUS, A.S.;
MC CULLUCH, P.B.:
The relevance of platelet and fibrinogen kinetics
and coagulation studies to extend of disease and
performance status in patients with adenocarci-
noma.
Can. Med. Pediatr. Oncol. 8/4, 367-374 (1980).
111. WOOD, S. Jr.:
Pathogenesis of metastasis formation observed in
vitro in the rabbit ear chamber.
Archives of Pathology 66, 550 (1958).

112. WOOD, S.; HILGARD, P.Jr.:
Arvin-induced hypofibrinogenemia and metastasis
formation from blood-borne cancer cells.
Johns Hopk. Hosp. med. J. 133, 207 (1973).
113. YIN, E.T.; WESSLER, S.; STOLL, P.J.:
Identity of plasma-activated factor X inhibitor
with antithrombin III and heparin cofactor.
Journal of Biological Chemistry 246, 3712 (1971).
114. YODA, Y.; ABE, T.:
Fibrinopeptide A (FPA) level and fibrinogen kinetics in patients with malignant disease.
Thromb. Haemost. 46 (4), 706-709 (1981).
115. ZACHARSKI, L.R.; HENDERSON, W.G.; RICHLES, F.R.
et al.:
Rational and Experimental Design for the va
Cooperative Study of Anticoagulation (Warfarin)
in The Treatment of Cancer.
Cancer 44, 732-741 (1979).
116. ZÄNKER, K.S.; STAVRON, D.; BLÜMEL, G.:
Fibrin degradation products, produced by glioma
cell-associated fibrinolysis and the partial inhibition of cell growth and migration in tissue culture.
Cell. Molec. Biol. 25, 387 (1980).
117. ZOLLINGER, H.U.:
Pathologische Anatomie, Band I, Seite 90,
G. Thieme, Stuttgart 1969.

D A N K S A G U N G

Herrn Professor Dr. med. W. Wilmannsdanke ich für die freundliche Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. W. Klaubert für die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen und der Abfassung der Arbeit.

Bei der statistischen Ausarbeitung wurde ich von Herrn Dr. E. Hasford, in medizinisch-technischen Fragen von Frau E. Doischer und Frau B. Reinhardt beraten.

Bei ihnen bedanke ich mich für ihre Mithilfe.

Lebenslauf

- 2.12.1955 Geboren in Bad Säckingen als Tochter des Bundesbahnobersekretärs Emil Agster und seiner Ehefrau, der Schneidermeisterin Margaretha Agster, geb. Frank.
- 1962-1966 Besuch der Grundschule in Schwörstadt
- 1966-1972 Scheffel-Gymnasium in Bad Säckingen
- 1972-1974 Gymnasium Rheinfelden
- 1974 Abitur
- 1974-1976 Schule für med.-techn. Assistentinnen der Universität Freiburg i.Brsg.; Abschluß als med.-techn. Radiologieassistentin.
- 1976-1977 Berufstätig als med.-techn. Radiologie-assistentin an den Fachkliniken Kandertal/ am Blauen für Erkrankungen der Atmungsorgane
- 1977-1978 Schule für med.-techn. Assistentinnen der Universität Freiburg i.Brsg.; Abschluß als med.-techn. Laboratoriumsassistentin.
- 1978-1979 Berufstätig als med.-techn. Radiologie-assistentin im Röntgeninstitut Dr. med. B. Dörflinger, München.
- 1979-1985 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Ärztliche Vorprüfung SS 1981
1. Abschnitt der Ärtzl. Prüfung SS 1982
2. Abschnitt der Ärtzl. Prüfung SS 1984
- Praktisches Jahr:
- Klinikum Großhadern Gynäkologie
- Klinikum Ingolstadt Innere Medizin
- Städt. Krankenhaus
- München Schwabing Chirurgie
3. Abschnitt der Ärtzl. Prüfung SS 1985

